

Vorkerndarstellung
bei Schweinezygoten

Friedrich Vogel



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0011

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Kräußlich

Vorkerndarstellung bei Schweinezygoten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Friedrich Vogel
aus
Schrozberg

München 1985

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. H. Kräußlich

Korreferent: Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

INHALTSÜBERSICHT

1.	Einleitung	3
2.	Literatur	4
2.1.	Embryotransfer beim Schwein	4
2.1.1.	Synchronisation und Superovulation	5
2.1.2.	Embryogewinnung	11
2.1.3.	In vitro Kultur	16
2.1.4.	Transfer	19
2.2.	Vorkerndarstellung in vivo und in vitro	23
2.2.1.	Färbung	24
2.2.2.	Fluoreszenz	24
2.2.3.	Zentrifugation	25
2.2.4.	Interferenzkontrast	26
2.3.	Tierzüchterische Aspekte	26
3.	Material	30
4.	Methoden	31

5.	Ergebnisse eigener Untersuchungen	40
5.1.	Embryogewinnung beim Schwein	40
5.1.1.	Superovulation	40
5.1.2.	Embryogewinnung	42
5.2.	In vitro Kultivierung	44
5.3.	Vorkerndarstellung	45
5.4.	Transfer	47
6.	Diskussion	50
7.	Mögliche Schlußfolgerungen für die Tierzucht	58
8.	Zusammenfassung	60
9.	Literaturverzeichnis	63

1. Einleitung

Um die Effektivität in der Tierzucht zu steigern, wurden in der Vergangenheit Verfahren entwickelt, die die Anzahl der Nachkommen besonders wertvoller Elterntiere erheblich steigern können.

So wird seit langem bei allen landwirtschaftlichen Nutztieren die künstliche Besamung durchgeführt, die es ermöglicht, ein Vatertier mit sehr vielen weiblichen Tieren zu paaren. Mit der Verwendung von Tiefgefriersperma ist es außerdem möglich, die Erbmasse eines Vatertieres über lange Zeit einzusetzen oder zu konservieren. Ein weiterer Vorteil dieser Maßnahme sind die relativ geringen Kosten.

Mit der Entwicklung des Embryotransfers, der zunächst zur Klärung wissenschaftlicher Fragen diente, wurde es dann auch möglich, die Zahl der Nachkommen eines züchterisch besonders wertvollen Muttertieres über dessen physiologische Fortpflanzungskapazität hinaus zu erhöhen. Im Gegensatz zum Rind, wo die züchterische und kommerzielle Nutzung des Embryotransfers schon eine Rolle spielt, wird diese Biotechnik beim Schwein bislang vor allem in Hygiene- und Sanierungsprogrammen eingesetzt.

Die rasche Fortentwicklung gentechnologischer Methoden, vor allem auf dem Gebiet der in vitro DNS-Rekombination, erlaubt es, Promotor- und Strukturgensequenzen zu entschlüsseln, zu klonieren und neu zu kombinieren. Der Einsatz dieser Techniken blieb bis vor kurzem auf die genetische Veränderung von Bakterien- bzw. Zellkulturen beschränkt.

Durch die Kombination von Embryotransfer und Gentechnologie erscheint es nun möglich, gezielte Genomveränderungen auch bei Säugetieren vornehmen zu können. Voraussetzungen für einen erfolgreichen Gentransfer sind die Gewinnung und Übertragung geeigneter embryonaler Entwicklungsstadien, die Mikroinjektion und bei Embryonen landwirtschaftlicher Nutztiere auch die Vorkern- bzw. Kerndarstellung.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich damit, die Voraussetzungen für einen erfolgreichen Gentransfer beim Schwein zu schaffen; sie umfaßt die Gewinnung, den Transfer und die Kultur von Schweineembryonen im Ein- und Zweizellstadium und die Vorkerndarstellung durch Zentrifugation.

2. Literatur

2.1 Embryotransfer beim Schwein

Bereits Ende des letzten Jahrhunderts wurde der erste erfolgreiche Embryotransfer von HEAPE (1891) durchgeführt. Für seine Versuche verwendete er Kaninchen. Er wollte die Frage beantworten, ob das uterine Milieu einen Einfluß auf den Phänotyp der Tiere hat. In einem Überblick zur Geschichte des Embryotransfers gibt BETTERIDGE (1981) an, daß der nächste Embryotransfer beim Kaninchen erst wieder 1922 glückte. Danach beschleunigte sich die Entwicklung, so wurden 1933 bei der Ratte, 1934 bei Schaf und Ziege und 1951 beim Rind erfolgreiche Transfers durchgeführt. Ebenfalls 1951 gelang KVASNICKII der erste erfolgreiche Embryotransfer beim Schwein, er erzielte aus drei Transfers eine Trächtigkeit, die Embryonen hatte er von geschlachteten Sauen gewonnen.

Der Embryotransfer beim Schwein wurde in der Anfangsphase vor allem zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen wie Einfluß der uterinen Kapazität auf die Implantationsrate, intrauterine Wanderung der Embryonen oder zur Erforschung maternaler Effekte eingesetzt. Nachdem die Erfolgsraten beim Schwein relativ konstant waren, wurden auch praktische Einsatzmöglichkeiten erprobt, beispielsweise der Transport von Schweineembryonen anstelle von lebenden Tieren zur Umgehung veterinärpolizeilicher Importbeschränkungen. Weitere Einsatzmöglichkeiten sind die Erhöhung der Nachkommenschaft eines genetisch wertvollen Muttertieres und der Einsatz des Embryotransfers in Hygiene- und Sanierungsprogrammen, MARTIN (1983). Nach wie vor bleibt aber der Embryotransfer ein wichtiges Instrument bei Versuchen mit präimplantativen Embryonen, vor allem wenn es darum geht, die Lebensfähigkeit der Embryonen nach in vitro Kultur, in vitro Fertilisation oder Mikromanipulation zu überprüfen.

2.1.1. Synchronisation und Superovulation

Da die Embryonen auf ein adäquates Eileiter- bzw. Uterusmilieu angewiesen sind müssen die Zyklen der Spender- und Empfängertiere synchronisiert werden, wenn nicht ein genügend großes Tiermaterial zur Verfügung steht, in dem stets mehrere Tiere den gleichen Zyklusstand haben. Nach DZIUK (1969) ist eine Herde von mindestens 126 Tieren nötig um jeweils 6 zyklussynchrone Tiere zur Verfügung zu haben. Um möglichst viele Embryonen von einem Spendertier gewinnen zu können, versucht man durch entsprechende Dosierung der eingesetzten Hormone eine Superovulation auszulösen.

Synchronisation

Da beim Schwein die Möglichkeiten der Zyklusdiagnose etwa durch die Erstellung von Hormonprofilen oder durch tägliche Rauschekontrolle relativ aufwendig sind, wird man die in einem Schweinebetrieb vorhandenen Tiere hinsichtlich ihrer Synchronisierbarkeit in zwei Gruppen einteilen. Zur Gruppe der leicht zu synchronisierenden Tiere gehören präpuberale Jungsauen und laktierende Altsauen. In die zweite Gruppe gehören geschlechtsreife Jungsauen und Altsauen mit unbekanntem Zyklusstand.

Präpuberale Jungsauen lassen sich durch Rauscheauslösung mit Gonadotropinen gut synchronisieren, DZIUK und POLGE (1965), BAKER und DOWNEY (1975), BRAUNE und SCHLEGEL (1975), wobei etwa 80% der Tiere nach 3-4 Tagen in Rausche kommen. Diese Tiere reagieren am besten, wenn sie kurz vor der Geschlechtsreife stehen, also etwa ab dem 5. Lebensmonat, SCHILLING und CERNE (1973) oder bei einem Gewicht von mindestens 70 kg, HOLTZ et al. (1978). MAJERCIAK et al. (1969) und (1970) geben 14 Wochen als Mindestalter zur Stimulierung und Embryogewinnung an, jüngere Tiere reagieren entweder nicht auf die Stimulierung oder es werden trotz guter Rauschesymptome nur unbefruchtete Eizellen gewonnen. Entweder ist bei diesen jungen Tieren die Uterusmotorik für den Spermientransport noch nicht genügend entwickelt oder die Eizellen können noch nicht voll ausreifen. Ähnliche Ergebnisse erzielten OSTERMANN und SMIDT

(1973), die nach PMSG/hCG-Gabe nur bei Tieren, die mindestens 15 Wochen alt waren, Embryonen gewinnen konnten, jedoch war die Erfolgsrate mit durchschnittlich 3,4 Embryonen pro Tier gering.

Der Rauscheeintritt bei laktierenden Sauen kann durch Östrusinduktion am Tag des Absetzens oder am Tag nach dem Absetzen gesteuert werden, CHRISTENSON und TEAGUE (1975), REUTHER et al. (1975), HURTGEN und LEMAN (1979).

Kommen geschlechtsreife Jungsauen oder Altsauen zur Verwendung, so müssen deren Zyklen durch eine 15 bis 20-tägige Zyklusblockade synchronisiert werden, nach deren Abschluß dann die Rauscheauslösung erfolgt. Zur Zyklusblockade werden Progesteron oder Gestagene verwendet, die über eine Blockade des Hypothalamus die Ausschüttung von Gonadotropin-Releasing-Hormon verhindern.

Die ersten Präparate zur Zyklusblockade waren natürliches Progesteron BAKER et al. (1954), und Progesteronderivate, NELLOR et al. (1961), FIRST et al. (1963). Jedoch waren die Fruchtbarkeitsleistungen nach einer Zyklusblockade mit diesen Medikamenten unbefriedigend, da häufig eine zystische Reaktion der Eierstöcke beobachtet wurde. Dann wurde mit guten Erfolgen die nicht-steroidale, oral wirksame Substanz Methallibur, ein Hydrazinderivat eingesetzt, GERRITS et al. (1962), POLGE (1965), WEBEL et al. (1970b). Da diese Substanz jedoch teratogene Wirkungen zeigte, KING (1969), wurde sie in den westlichen Ländern verboten, während sie in den Ländern des Ostblockes noch routinemäßig eingesetzt wird. Nach diesem Verbot von Methallibur wurden Stoffe mit hoher gestagener Wirkung gesucht, die keine teratogenen Nebenwirkungen zeigen. Solche Präparate sind Oxolven^(R) und Allyltrenbolone (Regumate^(R)), beides Nortestosteronderivate. Beide wurden auf ihre Wirksamkeit hin untersucht, es ergab sich, daß sowohl das Oxolven^(R) MAYER und SCHÜTZE (1977), SCHÜTZE und MAYER (1977), ZEROBIN et al. (1977), als auch das Allyltrenbolone, DAVIS et al. (1979), KRAELING et al. (1981) orale Wirksamkeit mit sicherer Zyklusblockade verbinden und keine negative Auswirkung auf die Fruchtbarkeit im nachfolgenden Zyklus haben. Jedoch ist der Rauscheeintritt nach der Zyklusblockade über 2-3 Tage verteilt, eine gute Synchronisation ist daher nur zu erreichen, wenn die Tiere nach der Zyklusblockade mit Gonadotropinen behandelt werden, STOLLA (1976).

Der Einsatz von Prostaglandin zur Synchronisation von Schweinen ist begrenzt, da zyklische Corpora lutea erst ab dem 12. Tag auf eine Prostaglandinbehandlung ansprechen, DIEHL und DAY (1973), GUTHRIE und POLGE (1976b), LINDLOFF et al. (1976), und die endogene Luteal-regression bereits am Tag 17 abgeschlossen ist, ELLENDORFF und SMIDT (1984).

KRAELING und RAMPACEK (1977) konnten durch eine einmalige Gabe von Prostaglandin 5 Tage nach einer 15-tägigen Östradiolbehandlung eine gute Synchronisation und Fruchtbarkeit erzielen, wobei das Östradiol die Corpora lutea in einem prostaglandinempfindlichen Status hielt. GUTHRIE und POLGE (1976a) versuchten durch während des Zyklus mit PMSG und hCG induzierte, akzessorische Gelbkörper den Einsatz von Prostaglandin möglich zu machen. Wurde das Prostaglandin 12 Tage nach der hCG-Injektion verabreicht, kamen 70% der Tiere in Rausche. Da die Gelbkörper während der Trächtigkeit sehr gut auf eine Prostaglandinbehandlung ansprechen, ist eine gute Synchronisationsmöglichkeit durch Abortauslösung in der Frühträchtigkeit gegeben, GUTHRIE und POLGE (1978). Diese Methode wird vor allem von kommerziellen Gruppen in den USA angewandt.

Superovulation

Mit der Rauscheauslösung kann man gleichzeitig durch entsprechende Dosierung der Gonadotropine eine Superovulation auslösen. Dadurch läßt sich die Ovulationsrate, die bei Spontanovulation für Jungsauen von BOSTEDT (1980) mit 12,7 und von BLICHFELD und ALMLID (1982) mit 14,1 und bei Altsauen mit 16,8 von BOSTEDT (1980) angegeben wird, auf das Doppelte bis Dreifache steigern, STIDL (1978).

Zur Superovulation werden beim Schwein PMSG-Präparate oder PMSG/hCG-Kombinationspräparate eingesetzt. Die Verwendung von FSH hat sich nicht bewährt. Die Bildung und Reifung von Follikeln am Ovar wird durch die überwiegend FSH-artige Wirkung des PMSG erreicht, hCG löst mit seiner überwiegend LH-artigen Wirkung die Ovulation und die Luteinisierung des geplatzten Follikels aus. Bei der Verwendung von Kombinationspräparaten hat sich ein PMSG/hCG Verhältnis von 2:1 bewährt. Die geringere PMSG Dosierung bei Kombinationspräparaten ist wahrscheinlich auf einen additiven Effekt des hCG zurückzuführen, SCHLIEPER (1983).

Sowohl bei den PMSG-Einzelpräparaten als auch bei den Kombinationspräparaten ist mit steigender Dosierung auch mit höheren Ovulationsraten zu rechnen. So erzielt HUNTER (1964) durch Steigerung der Dosierung von 500 I.E. PMSG auf 1500 I.E. eine Steigerung der Ovulationsrate von 15,0 auf 38,5. BAKER und COGGINS (1968) stellen im Bereich von 250 I.E. PMSG bis 2000 I.E. PMSG einen linearen Anstieg der Ovulationsraten fest, für eine zusätzliche Ovulation sind dabei 45 I.E. PMSG notwendig. GUTHRIE et al. (1974) errechnen bei einem Superovulationsversuch 1,06 Ovulationen pro 100 I.E. PMSG im Bereich zwischen 600 und 1200 I.E. PMSG.

Bei den Kombinationspräparaten ist die Ovulationsrate von der Dosis aber auch vom Verhältnis der beiden Hormone abhängig, so erzielen BAKER und DOWNEY (1975) die besten Ovulationsraten mit einer Kombination von 400 I.E. PMSG und 300 I.E. hCG, wohingegen SCHLEGEL et al. (1978) die höchsten Ovulationsraten bei Kombinationen von 1:1 erreichen, bei hohen hCG-Dosierungen beobachten sie jedoch eine zeitliche Verschiebung der Ovulation. SCHLIEPER (1983) verwendet Kombinationspräparate mit einem PMSG/hCG Verhältnis von 2:1, durch Steigerung der Dosierung von 400 I.E. PMSG und 200 I.E. hCG auf 1200 I.E. PMSG und 600 I.E. hCG konnte die durchschnittliche Ovulationsrate von 20,8 auf 55,8 gesteigert werden.

Die heute am häufigsten verwendeten Dosierungen sind 1000 I.E. PMSG als Einzelpräparat und ein Kombinationspräparat von 400 I.E. PMSG und 200 I.E. hCG. Einige Ergebnisse aus Versuchen mit diesen Dosierungen sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Literaturübersicht, Superovulationsergebnisse bei präpuberalen Jungsauen

Autor	PMSG/hCG		hCG nach Std.		Anzahl Tiere	Ovulations- rate
SCHILLING u. MINAR (1971)	400	200	-	-	22	11,7
SCHILLING et al. (1971)	400	200	-	-	43	11,6
SCHILLING u. CERNE (1973)	400	200	-	-	27	10,4
BAKER et al. (1974)	400	200	-	-	10	20,0
HOLTZ et al. (1977)	400	200	-	-	78	14,3
POLANCO et al. (1978)	400	200	-	-	40	11,0-28,0
SCHLEGEL u. WÄHNER (1980)	400	200	-	-	28	12,5
HERRMANN (1979)	400	200	500	56	65	19,3
HERRMANN et al. (1981)	400	200	500	56	30	15,7
SCHLIEPER (1983)	400	200	500	56	21	20,8
BAKER u. COGGINS (1968)	1000		500	48	10	19,6
POPE et al. (1972)	1000		500	80	17	12,5
POPE et al. (1972)	1500		500	80	19	29,7
STIDL (1978)	1000		500	76	11	35,0
CHENG et al. (1982)	1000		500	72	73	22,6

Um die gebildeten Follikel möglichst synchron zur Ovulation zu bringen, hat sich beim Schwein eine hCG-Injektion, die 48-80 Stunden nach der PMSG- bzw. PMSG/hCG-Injektion erfolgt, bewährt, HÜHN und SCHLEGEL (1977). Bei Altsauen soll die hCG-Injektion früher erfolgen als bei Jungsauen, DAY (1980). Der Ersatz von hCG durch GnRH zur Ovulations-synchronisation bringt nach BAKER et al. (1974) und GUTHRIE (1977) keine befriedigenden Ergebnisse. VON KAUFFMANN und HOLTZ (1982) beobachten sogar einen verzögerten Ovulationsablauf, sie vermuten, daß diese Verzögerung auf die unterschiedlichen Angriffspunkte der beiden Hormone zurückzuführen ist. Während das hCG direkt am Ovar angreift, kann das GnRH nur über die Ausschüttung von FSH und LH aus dem Hypophysenvorderlappen wirken. Dagegen erzielen BERGFELD et al. (1979) und RAASCH et al. (1984) mit einer Kombination von 300 µg GnRH und 300 I.E. hCG bessere Ergebnisse als mit einer alleinigen Injektion von 500 I.E. hCG. Diese Ergebnisse wurden aber in Schweineproduktionsbetrieben gewonnen, so daß eine Übertragung auf die Anwendung in Embryotransferprogrammen, wo der Ovulationszeitpunkt möglichst exakt gesteuert werden soll, nicht ohne weiteres möglich ist.

Sind die Ovulationsraten bei der Superovulation sehr hoch, so ist mit etwas schlechteren Befruchtungsergebnissen zu rechnen. Ein Grund dafür ist, daß bei der Superovulation vermehrt unreife bzw. primäre Eizellen ovulieren. So findet HUNTER (1966) bei Ovulationsraten über 45 Ovulationen pro Tier 8% primäre Eizellen im Gegensatz zu 0,18%, die bei einer Spontanovulation zu erwarten sind, HANCOCK (1961). Bei diesen unreifen Eizellen tritt ebenfalls vermehrt Polyspermie auf, BAKER und COGGINS (1968), POLGE und DZIUK (1965); dies wird darauf zurückgeführt, daß die Zonareaktion ebenfalls nicht ausgereift ist. Dieses Phänomen tritt bei Spontanovulation nur bei zu später Besamung, also bei überalterten Eizellen, auf, HUNTER (1967b). Ebenso erhöht ist der Anteil an fragmentierten Eizellen, BAKER und COGGINS (1968). Die Fragmentation von Eizellen ist als Zeichen der Degeneration zu werten, DZIUK (1960).

2.1.2 Embryogewinnung

Technik

Die Embryogewinnung erfolgt beim Schwein entweder durch Operation oder aus dem während der Schlachtung exenterierten Reproduktionstrakt. Es wurden Versuche zur unblutigen Gewinnung von Schweineembryonen von ALTENHOF et al. (1982) durchgeführt, doch es konnten keine Embryonen ohne zusätzlichen operativen Eingriff gewonnen werden. Aufgrund der anatomischen Situation beim Schwein ergaben sich zwei Hauptprobleme, erstens die Passage der im Diöstrus bzw. der Gravidität sehr fest verschlossenen, ca. 15 cm langen Zervix und zweitens das Problem, daß es weder durch rektale Manipulation noch durch Medikamente, wie zum Beispiel Prostaglandin oder Oxytocin, möglich ist, die Spülflüssigkeit aus dem Uterus zurückzugewinnen.

Sollen Embryonen verwendet werden, die von Schlachttieren gewonnen wurden, ist nach HERRMANN und HOLTZ (1981) im Vergleich zu in situ gewonnenen Embryonen mit schlechteren Weiterentwicklungsraten bei der in vitro Kultur zu rechnen. Nach SCHLIEPER (1983) ist auch mit schlechteren Transferergebnissen zu rechnen. In ihren Untersuchungen konnte sie feststellen, daß noch gute Ergebnisse erzielt werden können, wenn die Embryonen unmittelbar nach der Tötung, also noch vor dem Brühvorgang, gewonnen werden.

Für die Embryogewinnung durch Operation sind mehrere Verfahren entwickelt worden. Eine von VENGE (1952) zur Gewinnung von Kaninchenblastozyten entwickelte Operationstechnik wurde von HANCOCK und HOVELL (1962) auf das Schwein übertragen und diente den meisten nachfolgenden Autoren als Grundlage. Die unterschiedlichen Modifikationen sollen dazu dienen, das Operationsverfahren möglichst einfach zu gestalten und dabei möglichst hohe Ausspülraten zu erzielen. Die Ausspülrate ist als Quotient aus der Anzahl der gewonnenen Embryonen und der Zahl der gezählten corpora lutea definiert.

Bei der Methode nach HANCOCK und HOVELL (1962) wird nach Laparotomie in der linea alba und Vorlagerung eines Ovars mit dem kranialen Teil des Uterushorns ein Plastikkatheter über den Fimbrientrichter eingeführt und anschließend mit einer aufgesetzten Spritze 30 ml Spülflüssigkeit in den Uterus gepreßt, der etwa 35 cm von der uterotubalen Verbindung entfernt manuell abgedichtet ist. Nun wird, nach einem Längsschnitt, etwa 8 cm von der Uterusspitze entfernt eine Glaskanüle von 10 mm Durchmesser eingesetzt und die Spülflüssigkeit durch Ausstreifen wiedergewonnen. Mit dieser Technik konnten sie eine Ausspülrate von 73% erzielen.

DZIUK et al. (1964) verändern diese Methode dahingehend, daß sie den Uterus mit einer Darmklemme abdichten und zusätzlich 20 ml Spülflüssigkeit kranial der Darmklemme in das Uteruslumen injizieren. Sie konnten eine Ausspülrate von 83% erzielen. SMIDT et al. (1965) verwenden anstatt des Plastikschräuchs eine Knopfkanüle und anstelle der Glaskanüle eine Injektionskanüle. Sie führten die Spülungen entweder am letzten Tag der Rausche, am ersten, zweiten oder dritten Tag nach Ende der Rausche durch, dabei konnten sie jeweils Ausspülraten von 57%, 90%, 56% und 44% erreichen, die großen Unterschiede sind wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß immer nur ein kleiner Anteil des Uterus in den Spülvorgang miteinbezogen wurde, so ist nicht auszuschließen, daß sich die Embryonen am Tag 2 und 3 nach Ende des Östrus bereits weiter caudal im Uterushorn befanden.

VINCENT et al. (1964) gewinnen die Embryonen nur aus dem Eileiter, um zu untersuchen, ob man die Spendertiere gleichzeitig als Empfänger nutzen kann. Sie injizieren die Spülflüssigkeit in der Nähe der uterotubalen Verbindung in den Eileiter, diese wird über einen kleinen Trichter, der im ovarseitigen Ende des Eileiters befestigt ist, zurückgewonnen. Mit dieser Methode konnten sie eine Ausspülrate von 83% erreichen, die Methode der alleinigen Eileiterspülung bringt aber nur bis 48 Stunden nach der Ovulation befriedigende Ergebnisse, weil sonst die ersten Embryonen bereits in den Uterus transportiert worden sind, ALLEN (1984). Zu demselben Ergebnis kommt POLGE (1966) der die beiden Verfahren von VINCENT et al. (1964) und HANCOCK und HOVELL (1962) vergleicht und dabei Ausspülraten von 63% bzw. 87% erzielt.

Die meisten Autoren weisen darauf hin, daß mit zunehmendem Abstand zwischen Ovulation und Embryogewinnung die Ausspülraten schlechter werden, jedoch konnten HUNTER et al. (1967) in einem Versuch zur Gewinnung von Blastozysten am Tag 6, 7 und 8 nach Beginn des Oestrus noch Ausspülraten von 75,3%, 77,1% und 81,3% erreichen.

Um auf die Darmklemme verzichten zu können, setzen JAMES und REESER (1979) stattdessen 8-25 cm von der uterotubalen Verbindung entfernt eine Glaskanüle in den Uterus ein, so kann die Spülflüssigkeit während des Spülvorganges kontinuierlich ablaufen. In diesem Versuch werden dieselben Tiere im Abstand von 3-6 Wochen mehrmals gespült, um zu untersuchen, ob zum einen eine mehrmalige Verwendung von Spendertieren möglich ist, und ob zum anderen die Spender nach einer Embryogewinnung wieder normale Reproduktionsleistungen erbringen können. Allerdings muß dafür unter sterilen Bedingungen operiert werden, alle Organe müssen so schonend wie möglich behandelt werden und ständig mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung benetzt werden. Beim Verschuß der Bauchdecke wurde das Peritoneum gesondert genäht. Unter diesen Voraussetzungen wurden nur wenige Verklebungen an den inneren Organen und eine geringe Bildung von Narbengewebe in der Bauchdecke beobachtet.

Statt der Glaskanüle kann auch ein Katheter mit aufblasbarem Ballon an der Spitze zur Gewinnung der Spülflüssigkeit eingesetzt werden, DAVIS und JAMES (1984). BAKER (1979) hält diese Methode für besser, weil dadurch die Uteruswand weniger beschädigt wird.

Beim Schwein ist eine retrograde Spülung des Eileiters, wie etwa beim Schaf, durch den Verschußmechanismus der uterotubalen Verbindung während und kurz nach dem Oestrus, ANDERSEN (1928), HUNTER (1973), nicht möglich. Die Ergebnisse der Spülung in vivo sind vergleichbar mit denen, die am exentrierten Genitaltrakt erzielt werden, SCHLIEPER (1983).

Als Spülflüssigkeit dienen einfache Salzlösungen wie Tyrode's solution, oder die üblichen Kulturmedien wie TCM 199 mit Bicarbonatzusatz, BMOC-2 oder PBS mit jeweils verschiedenen Serum- und Antibiotikazusätzen.

In Tabelle 2 sind einige Ergebnisse der Embryogewinnung in vivo zusammengefaßt.

Tabelle 2: Literaturübersicht, Embryogewinnung in vivo

	Tag nach der Ovu- lation	Anzahl Tiere	miteinbezogene Anteile des Re- produktions- traktes	Ausspül- rate
HANCOCK u. HOVELL (1962)	2	8	Eileiter+Uterus	73 %
DZIUK et al. (1964)	2 - 2,5	29	Eileiter+Uterus	83 %
VINCENT et al. (1964)	1	25	Eileiter	83 %
SMIDT et al. (1965)	1	35	Eileiter+Uterus	90 %
POLGE (1966) (1)	2	30	Eileiter	63 %
POLGE (1966) (2)	2	30	Eileiter+Uterus	87 %
HUNTER et al. (1967)	6/7/8	38	Uterus	78 %
BAKER u. COGGINS (1968)	1 - 2	40	Eileiter+Uterus	81 %
HUNTER (1974)	1	76	Eileiter+Uterus	86 %
STIDL (1978)	1	8	Eileiter	69 %
BAKER (1979) (3)	2	18	Eileiter+Uterus	88 %
BAKER (1979) (4)	2 - 4	20	Eileiter+Uterus	91 %
KRUFF et al. (1981)	3	26	Eileiter+Uterus	91 %

(1) Methode nach VINCENT et al. (1964)

(2) " " HANCOCK und HOVELL (1962)

(3) " " DZIUK et al. (1964)

(4) Katheter mit aufblasbarem Ballon an der Spitze

Frühembryonale Entwicklung

Für bestimmte Versuche mit Embryonen werden genau definierte Entwicklungsstadien benötigt, so zum Beispiel für manche Kulturversuche Ein- und Zweizeller oder 4- bis 8-Zeller für die Isolation einzelner Blastomeren. Daher muß man den zeitlichen Ablauf der Entwicklungsvorgänge von der Ovulation bis zur Implantation, der bei den einzelnen Säugetierarten unterschiedlich ist, kennen.

Die Ovulation findet 24-36 Stunden, PERRY und ROWLANDS (1962) bzw. 24-48 Stunden, OXENREIDER und DAY (1965), nach Rauschebeginn statt. Wird die Ovulation durch Injektion von hCG induziert, so findet die Ovulation 40-42 Stunden nach dieser Injektion statt, DZIUK und BAKER (1962), HUNTER (1967a). Die Eizellen werden schnell durch die proximale Hälfte des Eileiters transportiert, die Befruchtung findet dann im Mittelstück des Eileiters statt, ALANKO (1965).

HANCOCK (1961) fand frühestens 5 1/2 Stunden nach dem Deckakt Spermien zwischen den Cumuluszellen. Nach induzierter Ovulation beobachtet HUNTER (1972) bereits 3 Stunden nach der erwarteten Ovulation 23,7% und 5 Stunden danach 71,9% befruchtete Eizellen. Das Einzellstadium dauert beim Schwein etwa 12-13 Stunden, das Zweizellstadium etwa 6-8 Stunden, während das Vierzellstadium 20-24 Stunden andauert, HANCOCK (1961), HUNTER (1974).

Im Vierzellstadium treten die Eizellen in den Uterus ein, somit befinden sich die Eizellen beim Schwein nur etwa 48 Stunden im Eileiter, im Gegensatz zu den meisten anderen Säugetieren, deren Eileitertransport etwa 72 Stunden dauert, ALLEN (1984). Etwa 52 Stunden nach der Befruchtung teilen sich die Embryonen zum Achtzeller, gleichzeitig werden die Teilungsvorgänge asynchron.

Morulae mit 16 bis 32 Zellen werden dann gegen Ende des dritten Tages der Entwicklung beobachtet. Bis zum fünften Tag wird die Blastozyste gebildet, die am sechsten Tag aus der Zona pellucida schlüpft, HUNTER (1974) und dann mit der für diese Tierart charakteristischen Elongation beginnt, ALLEN (1984). Bis zum zwölften Tag werden die Embryonen gleichmäßig auf beide Uterushörner verteilt, POLGE und DZIUK (1970). Die Implantation beginnt am 13. Tag mit der Ausbildung erster Zellkontakte zwischen Embryohüllen und Endometrium, ALLEN (1984).

2.1.3 In vitro Kultur

Sollen Embryonen längere Zeit außerhalb des uterinen Milieus aufbewahrt werden, etwa für einen längeren Transport oder für Mikromanipulationen, muß ein geeignetes Kulturmedium zur Verfügung stehen.

Die Medien, die für die Kultur von Schweineembryonen eingesetzt werden, bestehen im Prinzip aus einer Salzlösung in Kombination mit einem Puffersystem zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes. Hierfür gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Systeme, zum einen die Verwendung eines Phosphatpuffers, zum anderen das Bicarbonatpuffersystem. Durch die Konzentration des Bicarbonats und den CO_2 -Gehalt in der Gasatmosphäre läßt sich der pH-Wert einstellen. So ergibt zum Beispiel eine Konzentration von 25 mmol Bicarbonat pro Liter Medium bei einer CO_2 Konzentration von 5% einen pH-Wert von 7,2. Der optimale pH-Wert für die Kultur von Schweineembryonen liegt nach POLGE (1977) zwischen 6,9 und 7,2. Weitere wichtige Punkte sind die Einhaltung einer konstanten Temperatur von $37-37,5^\circ \text{C}$ und der osmotische Druck. Die Osmolarität, die 280 mosmol betragen soll, wird über die im Medium gelösten Substanzen eingestellt. Zusätzlich werden dem Kulturmedium meist noch Serum, Antibiotika und Antimykotika sowie Energiesubstrate wie z.B. Glucose zugesetzt.

Die Seren von Mensch, Rind, Schwein, Schaf und Huhn enthalten einen embryotoxischen Faktor, CHANG (1949), der durch 30-minütiges Erhitzen bei 55°C zerstört werden kann. BRINSTER (1965b) gibt folgende Erklärungen für die positiven Wirkungen eines Serumzusatzes: 1) Aminosäurenquelle, 2) Chelatbildner, 3) Enzym- und Zellmembranschutz, 4) Regulator von Oxidations- und Reduktionspotentialen.

Zur Kultur von Schweineembryonen eignen sich vor allem heterologe Seren, ROBL und DAVIS (1981) erhalten die besten Ergebnisse durch den

Zusatz von 20% Lammserum, der Zusatz von 10% Schweineserum erbrachte schlechtere Ergebnisse. Ähnliche Beobachtungen machen KRUFF et al. (1983), bei einem Zusatz von 20% foetalem Ferkelserum war nur eine Entwicklung für einen Tag möglich, bei Zusatz von 20% Lammserum war eine dreitägige Kulturdauer möglich.

HERRMANN und HOLTZ (1981) vergleichen die Kultivierungsergebnisse nach Zusatz von jeweils 20% foetalem Kälberserum, gefrieretrocknetem Rinder Serumalbumin, Schlachtrinderserum, Kaninchenserum und Schlachtschweineserum. Die besten Ergebnisse wurden beim Zusatz von 20% Schlachtrinderserum erzielt. Beim Vergleich von Rinder Serumalbumin (BSA) und hitzebehandeltem Schweineserum fanden MENINO und WRIGHT (1982) die besten Weiterentwicklungsraten bei einem Zusatz von 15 mg BSA/ml. Sehr gute Ergebnisse erzielten STONE et al. (1984b) durch Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem Humanserum.

Die am häufigsten verwendeten Medien für die Kultur von Schweineembryonen sind Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) aus der Gruppe der phosphatgepufferten Medien sowie Brinster's medium for ovum culture (BMOC-2), BRINSTER (1965c) und Whitten's medium, WHITTEN und BIGGERS (1968), aus der Gruppe der bicarbonatgepufferten Medien. Komplex zusammengesetzte Zellkulturmedien wie TCM 199 und HAM's F 10 haben sich nicht durchgesetzt.

Schweineembryonen, die das Vierzellstadium überwunden haben, können sowohl in BMOC-2, DAVIS und DAY (1978), NIEMANN et al. (1983a) in PBS KRUFF et al. (1983), in Whitten's Medium, WRIGHT (1977) und in Minimum Essential Medium (MEM), STONE et al. (1984b) bis zur geschlüpften Blastozyste kultiviert werden.

Bei der Kultivierung von Embryonen, die das Vierzellstadium noch nicht erreicht haben, werden unterschiedliche Ergebnisse angegeben. So berichten RUNDELL und VINCENT (1968) über Kulturversuche in 65 verschiedenen Medienkombinationen. Die besten Ergebnisse bei der Kultur von Ein- bis Vierzellstadien erzielten sie in modifiziertem BMOC mit und ohne Zusatz von 5% foetalem Kälberserum. Nach Transfer der kultivierten Embryonen konnten sie jedoch keine Trächtigkeit erzielen.

In einem weiteren Versuch beobachteten RUNDELL und VINCENT (1969) Teilungsraten von 55% bei Einzellern und 53% bei Zweizellern, aber keine Trächtigkeiten nach dem Transfer der kultivierten Embryonen. Auch SCHNEIDER et al. (1975) berichten über eine verminderte Weiterentwicklung dieser Stadien in Tervit's SOF.

Nur POPE und DAY (1970) können bei der Kultur von Ein- und Zweizellstadien in BMOC-2 mit Glucosezusatz (1 g/l) Teilungsraten von 88,9% und 95,9%. Nach 24-stündiger Kultur wurden 69 Embryonen auf 6 Empfänger-tiere übertragen, davon wurden 5, bei einer Embryoüberlebensrate von 57%, trüchtig. Nach 48-stündiger Kultur übertrugen POPE und DAY (1977) 189 Embryonen auf 13 Empfänger, daraus resultierten 2 Trächtigkeiten, die Embryoüberlebensrate betrug 8%. Sie weisen jedoch darauf hin, daß die schlechteren Ergebnisse nicht unbedingt auf die längere Kulturdauer zurückzuführen sind, da sich Vergleichsembryonen aus dem ersten Versuch bis zur Blastozyste entwickelten, im zweiten Versuch konnte keine Blastozystenbildung beobachtet werden.

Bei der Kultivierung von Einzellstadien in Whitten's Medium mit Zusatz von Rinderserumalbumin (15 g/l) können LINDNER und WRIGHT (1978) einen von 23 Ein- und Zweizellern bis zur Blastozyste kultivieren. Ebenfalls in Whitten's Medium mit 15 g Rinderserumalbumin pro Liter können MENINO und WRIGHT (1982) von 29 Einzellern 6 bis zur Blastozyste kultivieren.

In zwei Versuchen zur Kultur von Zweizellstadien in PBS berichten HERRMANN et al. (1981) und HERRMANN und HOLTZ (1981) jeweils nur über eine geringe Weiterentwicklung, nur wenige Embryonen hatten nach 72-stündiger Kultur das Vierzellstadium überschritten. STIDL (1978) kultiviert 47 Einzeller in Basal Synthetic Medium II (BSM II) davon entwickelten sich 16 weiter, 10 Embryonen hatten nach 96 Stunden das Achtzellstadium erreicht.

2.1.4. Transfer

Der Transfer der Embryonen wird beim Schwein ebenfalls chirurgisch durchgeführt. POLGE und DAY (1968) berichten über einen erfolgreichen unblutigen Transfer. Doch von 17 Empfängern wurde nur ein Tier trächtig. Hier ergeben sich ähnliche Probleme wie bei der unblutigen Embryogewinnung, nämlich die Cervixpassage und die Gefahr der Uterusperforation durch den Katheter.

Das operative Vorgehen gleicht dem der Embryogewinnung. In Vollnarkose wird nach dem Öffnen der Bauchhöhle eine Seite des Uterus mit dem Ovar vorgelagert. Die Embryonen sollen an den Ort übertragen werden, der ihrem Entwicklungsstand entspricht, das heißt, Embryonen im Ein- und Zweizellstadium werden in den Eileiter, Embryonen mit vier und mehr Blastomeren werden in den Uterus übertragen, DAY (1979).

In der Regel werden Embryonen nur auf eine Seite übertragen, da es beim Schwein ohnehin zur Überwanderung ins andere Horn kommt, DZIUK et al. (1964), WAITE und DAY (1967). Für die Übertragung in den Eileiter wird eine Glaspipette oder ein Katheter über den Fimbrientrichter ca. 5 cm tief in den Eileiter eingeführt und die Embryonen dort abgesetzt.

Um Embryonen in den Uterus zu übertragen, gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten. Man kann die Uteruswand mit dem stumpfen Ende einer Nadel perforieren und durch diese Wunde den Plastikschauch oder die Pipette einführen, DAVIS und JAMES (1984). Allerdings muß darauf geachtet werden, daß die Spitze der Pipette wirklich im Lumen liegt. Bei der anderen Methode wird der Eileiter im distalen Bereich perforiert und über die Perforationsstelle ein Plastikkatheter in die Uterushornspitze vorgeschoben, DAY (1979).

Als Alternative zur Laparotomie in der linea alba beschreiben MEREDITH et al. (1979) ein Verfahren, bei dem nach einem Flankenschnitt ein Laparoskop mit Faßzange in die Bauchhöhle eingeführt und damit der

Uterus fixiert wird. Mit einer Spezialkanüle wird die Bauchwand durchstoßen und der Eileiter perforiert. Durch diese Kanüle wird dann ein Plastikschauch zur Übertragung der Embryonen in den Uterus vorgeschoben.

Wie bei der Embryogewinnung dienen auch hier die verschiedenen Transfermethoden dazu, möglichst wenig Läsionen am Uterus oder am Eileiter zu setzen, um Resorptionsvorgänge zu vermeiden, die durch Leukozyteninfiltration die Nidation verhindern. Außerdem können Verklebungen im Bereich des Uterus den Geburtsvorgang behindern.

Beim Embryotransfer sollten sich Spender und Empfänger im gleichen Zykluszustand befinden. WEBEL et al. (1970a) stellen zwar fest, daß die Trächtigkeitsrate im Vergleich zu synchronen Transfers etwa gleich gut ist, wenn der Spender bis zu zwei Tage früher oder bis zu einem Tag später im Oestrus war als der Empfänger. Im Gegensatz dazu stellten BAZER et al. (1969) bei Transfers auf frühträchtige Empfänger fest, daß Embryonen, die jünger sind als die im Uterus befindlichen Embryonen, schlechtere Überlebensraten haben im Vergleich zu gleich guten Überlebensraten, wenn die Embryonen gleich alt waren. Vergleichbare Ergebnisse erzielen POPE et al. (1982), sie übertrugen Tag-7 Embryonen und Tag-5 Embryonen auf Tag-6 Empfängertiere, am Tag 11 der Trächtigkeit bestand kein Unterschied zwischen den Embryoüberlebensraten, doch bis zum 60. Trächtigkeitstag hatten sich signifikant mehr Tag-7 Embryonen weiterentwickelt. Ebenso findet POLGE (1982) an einem großen Tiermaterial etwas bessere Embryoüberlebensraten, wenn die Empfänger einen Tag nach den Spendern in Rausche kamen. ADAMS (1982) erklärt die besseren Erfolge damit, daß die Embryonen allein durch die Manipulationen während der Gewinnung und dem Transfer eine Entwicklungsverzögerung von 12 Stunden erfahren.

Beim Transfer kultivierter Embryonen sollen die Empfänger einen Zyklusrückstand von 24 Stunden haben, BASKEEV et al. (1982), da man davon

ausgehen kann, daß sich die Embryonen in vitro langsamer weiterentwickeln als in vivo. So fanden NIEMANN et al. (1983a) eine Verzögerung von 24-48 Stunden bei der Kultivierung von Vierzellern und eine Verzögerung von 12-24 Stunden bei der Kultivierung von weiterentwickelten Stadien.

Für die routinemäßige Durchführung des Embryotransfers empfiehlt DAY (1979), die Embryonen im 4- bis 8- Zellstadium zu übertragen. Diese Embryonen sollen im Hinblick auf normale Teilungsvorgänge leichter zu beurteilen sein als andere Stadien. Morulae können z. B. mit unbefruchteten Eizellen verwechselt werden, und bei Einzellern stellt sich die Frage der Befruchtungskriterien. Dagegen vertritt KRUFF (1982) die Auffassung, daß 16-Zeller oder Morulae besser geeignet sind als Vierzeller, er verweist auf die Schwierigkeiten, die sich bei der Klassifizierung aus der 24-stündigen Ruheperiode im Vierzellstadium ergeben. Der gleichen Meinung sind auch JAMES et al. (1983), sie hatten deutlich bessere Ergebnisse nach Transfer von Morulae. Der Transfer von Blastozysten bringt, wie HUNTER et al. (1967) und WEBEL et al. (1970) herausfanden, wieder wesentlich schlechtere Ergebnisse.

Die Anzahl der Embryonen, die übertragen werden sollen, wird von POLGE (1966) untersucht. Er kommt zu dem Ergebnis, daß nach einem Transfer von 7-9 Embryonen pro Tier die Embryoüberlebensrate größer ist als beim Transfer von 14-17 Embryonen, jedoch war bei letzterer Gruppe die Wurfgröße höher. Genauso konnten POPE et al. (1972) feststellen, daß bei Erhöhung der Zahl der übertragenen Embryonen von 12 auf 24 pro Empfänger die Anzahl der Feten am Tag 25 der Trächtigkeit größer ist, im Gegensatz zu POLGE (1966) konnten sie aber auch eine Erhöhung der Trächtigkeitsrate feststellen.

Die Transferergebnisse einiger Autoren, sind in Tabelle 3 zusammengefaßt:

Tabelle 3: Literaturübersicht, Transferergebnisse

Autor	Anzahl Tiere	Anzahl Embryonen	Embryonen pro Tier	Transfererfolge % Tr.(1) % EÜ(2)	Auto
KVASNICKII (1951)	3	13	2 - 9	33	44
HANCOCK u. HOVELL (1962)	6	86	14,3	50	73
DZIUK et al. (1964)	27	263	9,7	70	60
VINCENT et al. (1964)	20	219	11	60	73
POLGE (1966)	27	258	7-17	70	62
HUNTER et al. (1967)	10	107	10,7	30	43-80
WEBEL et al. (1970a)	45	587	13	46	50,2
WRATHALL et al. (1970)*	1	34	34	100	8,8
POPE et al. (1972)	7	84	12	71,4	56,7
POPE et al. (1972)	10	240	24	100	67,9
CURNOCK et al. (1976)	4	55	11-16	100	66
DAVIS und DAY (1978)*	6	100	16,7	83	75
MEREDITH et al. (1979)	10	143	8-26	60	49,4
JAMES et al. (1980)*	12	227	16-35	58	30-48
POLGE (1982)	240	3400	14	10-78	63,8

* nach 24 Stunden Kultur

(1) Trächtigkeitsrate (trächtige Empfänger/Empfänger gesamt)

(2) Embryoüberlebensrate bezogen auf trächtige Empfänger

2.2. Vorkerndarstellung in vivo und in vitro

Gametenentwicklung und Vorkernbildung

Bei der Bildung der männlichen und weiblichen Gameten wird deren Chromosomensatz durch zwei Reifeteilungen halbiert. Bei der ersten Reifeteilung entsteht aus der primären Spermatozyte/Oozyte mit einem tetraploiden Chromosomensatz die sekundäre Spermatozyte/Oozyte mit einem diploiden Chromosomensatz, der zweiten Reifeteilung geht keine DNS-Reduplikation voraus, so daß danach nur noch ein haploider Chromosomensatz übrig bleibt. Bei der Spermatozyte geschieht dies vor der Ausreifung zum eigentlichen Spermium. Die Eizelle wird als sekundäre Oozyte ovuliert, und die zweite Reifeteilung findet kurz nach dem Eindringen des Spermiums statt.

Nach dem Eindringen des Spermiums in die Eizelle lösen sich vom Spermienkopf die Kopfkappe und das Mittelstück ab. Der Kopfteil schwillt an und bildet durch Dekondensation der Chromosomen den männlichen Vorkern. Das Halsknötchen bildet den Spindelapparat für die erste mitotische Teilung. Der weibliche Vorkern entsteht ebenfalls durch Dekondensation der Chromosomen sofort nach dem Ende der zweiten Reifeteilung. Nach ihrer Entstehung nähern sich die beiden Vorkerne. Die Amphimixis vollzieht sich in der Mitte der Eizelle. Nachdem der neue Zellkern mit nunmehr wieder diploidem Chromosomensatz gebildet ist, ordnen sich die Chromosomen nach Reduplikation und Kondensation sofort zur Äquatorialplatte an und die befruchtete Eizelle tritt in die erste Mitose ein.

Vorkerndarstellung

Die Vorkerndarstellung in vitro diene vor allem der Erforschung der Vorgänge von der Spermienpenetration bis zur ersten mitotischen Teilung, BAKER et al. (1967), HUNTER (1974) und zur Feststellung des Befruchtungszeitpunktes, HANCOCK (1961). Außerdem kann die Vorkerndarstellung als Kriterium der erfolgreichen in vitro Fertilisation herangezogen werden, HARMS und SMIDT (1970), MEYER und SMIDT (1973a).

Die Vorkerndarstellung *in vivo* ist Voraussetzung für Experimente zur Manipulation am Genom von landwirtschaftlichen Nutztieren, da im Gegensatz zu den Zygoten von Maus und Kaninchen die Vorkerne bei Rind, Schaf und Schwein durch die dichten Granula innerhalb der Eizelle verdeckt sind. RÜSSE (1978) bezeichnet diese Granula als paraplastische Einschlüsse, die erst in der im Tertiärfollikel reifenden Eizelle gebildet werden. Die Granula sind nach RÜSSE (1978) bei Rind und Schaf relativ homogen, sie bestehen aus vesikulären, elektronenoptisch leer erscheinenden, membranbegrenzten, ovoiden, ca. 1,5 µm großen Bläschen. Beim Schwein dagegen sind unterschiedliche Strukturen zu finden, elektronenoptisch leer erscheinende Vesikel, verschieden dichte, granulierte, unregelmäßig geformte, 2 µm große Bläschen, sowie zahlreiche, bis 4 µm große Lipoidtropfen.

2.2.1. Färbung

Die bisher entwickelten Färbemethoden eignen sich nur zur Vorkerndarstellung *in vitro*, da dem eigentlichen Färbevorgang eine Fixierung der Eizellen bzw. der Embryonen vorausgeht. Zur Fixierung verwendet HANCOCK (1958) Azetalkohol und anschließend zur Färbung Acetocarmin. MEYER und SMIDT (1973b) vergleichen zwei verschiedene Färbungsmethoden: Acetoorcein eignete sich gut bei gleichzeitiger Verwendung eines Phasenkontrastmikroskopes. Mit der Färbung nach Giemsa konnte der doppelte Chromosomensatz als sicherster Beweis der Befruchtung dargestellt werden. Bei elektronenoptischen Untersuchungen zur Aufklärung der Ultrastruktur von befruchteten Eizellen verwenden SZOLLOSI und HUNTER (1973) und NORBERG (1973) die in der Elektronenmikroskopie übliche Färbung mit Schwermetallsalzen.

2.2.2. Fluoreszenz

Fluoreszenzmethoden sind sowohl für die Vorkerndarstellung *in vitro* als auch *in vivo* geeignet. Für die Vorkerndarstellung *in vitro* verwenden MEYER und SMIDT (1973b) Acridin-Orange. Diese Substanz ist jedoch zytotoxisch, Embryonen, die damit behandelt werden, entwickeln sich nicht weiter.

Zur Vorkerndarstellung *in vivo* bietet sich DAPI (4'6'-Diamidino-2-Phenylindol) an. Diese verbindet sich vor allem mit Adenin-Thymin-reichen Sequenzen der DNS. RUSSEL et al. (1975) verwenden diese Substanz zum Nachweis von Viren und Mykoplasmen in infizierten Zellen.

MINHAS et al. (1984) konnten bei 39 von insgesamt 102 mit DAPI behandelten Rinderzygoten jeweils zwei Vorkerne sichtbar machen, doch bei der nachfolgenden Kultur entwickelten sich diese Embryonen nicht mehr weiter. Bei Embryonen im Zweizellstadium konnten beide Kerne dargestellt werden. Von 7 behandelten Zweizellern entwickelten sich 2 bis zum Vierzellstadium. WAGNER et al. (1984) stellen mit derselben Methode Vorkerne bei Rinderzygoten dar, es gelang auch die Injektion von DNS und die Zygoten entwickelten sich bei der *in vivo* Kultur im Rindereileiter. Über Trächtigkeiten nach Transfer mit DAPI behandelter Zygoten wurde bisher nicht berichtet.

2.2.3. Zentrifugation

Der Grundgedanke der Zentrifugation von Embryonen ist, die Granula aufgrund ihrer vom Zytoplasma verschiedenen Dichte so auf einen Teil der Zelle zusammenzudrängen, daß Vorkerne oder Kerne sichtbar werden. Schon seit längerer Zeit weiß man, daß sich Kernstrukturen bei Seeigeleiern durch Zentrifugation darstellen lassen.

NANCARROW et al. (1984) konnten bei Schafembryonen nach einminütiger Zentrifugation bei 12000 g zwar eine Zusammenlagerung der Granula feststellen, jedoch wurden keine Vorkerne sichtbar. Beim Transfer der zentrifugierten Embryonen war die Trächtigkeitsrate im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich vermindert.

Über die Zentrifugation von Schweineembryonen berichten WALL et al. (1985). Bei 15000 g und einer Zentrifugationsdauer von drei Minuten konnten sie bei Embryonen im Ein- und Zweizellstadium die Vorkerne bzw. die Kerne darstellen. Nach einer zusätzlichen Färbung wurden die behandelten Embryonen in den einen Eileiter und unbehandelte Embryonen in den anderen Eileiter desselben Empfängertieres übertragen, um einen direkten Vergleich der Weiterentwicklung *in vivo* ziehen zu können.

Nach 4 Tagen wurden die Embryonen wieder zurückgewonnen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von NANCARROW et al. (1984) hatten sich die zentrifugierten Embryonen genauso wie die nichtzentrifugierten weiterentwickelt. Sie berichten auch über Zentrifugationsversuche mit Rinder- und Schafembryonen. Während die Vorkern- und Kerndarstellung bei Rinderembryonen glückte, konnten sie die Beobachtung von NANCARROW et al. (1984) bestätigen, daß eine Vorkerndarstellung bei Schafembryonen durch Zentrifugation nicht möglich ist.

2.2.4. Interferenzkontrast

Aus Untersuchungen von HAMMER et al. (1985) geht hervor, daß es möglich ist, die Vorkerne bei Schaf- und Ziegenzygoten mit Hilfe eines Interferenzkontrastmikroskops ohne weitere Manipulationen darzustellen. Bei Schweinezygoten war diese Technik jedoch nicht erfolgreich.

2.3. Tierzüchterische Aspekte

Mit der der Vorkerndarstellung in vivo bei den Zygoten von Schwein, Schaf, Ziege und Rind wurde erstmals die Möglichkeit eröffnet, die beim Labortier Maus erarbeiteten Methoden auf landwirtschaftliche Nutztiere zu übertragen. Dort wurden verschiedene natürliche Gene und künstliche Genkonstrukte in die Vorkerne von Mäusezygoten injiziert.

So berichteten GORDON und RUDDLE (1981) als erste über die erfolgreiche Injektion fremder Gene in Mäuseembryonen, deren Integration und Weitervererbung. Nach einer Geninjektion konnten BRINSTER et al. (1981) die Expression der fremden Gene feststellen, ebenso berichten WAGNER et al. (1981) über die Expression eines injizierten Kaninchen- β -Globin-Gens sowohl bei den behandelten Mäusen als auch bei deren Nachkommen, dadurch war das erste Säugetier zur Produktion eines artfremden Proteins befähigt.

Der wohl bedeutendste Erfolg auf dem Gebiet der Mikroinjektion war das Einbringen eines Genkonstrukts aus dem Metallothionein-Promoter der Maus und dem Wachstumshormogen der Ratte in Mäuseembryonen durch PALMITER et al. (1982). Da der Promoter auf Schwermetalle anspricht, konnte die Expression des Strukturgens durch orale Verabreichung von Zink induziert werden. Durch den erhöhten Spiegel an Wachstumshormon wurden die Tiere erheblich größer als Vergleichstiere.

Ein anderer Ansatz zum Gentransfer wurde von ROTTMANN et al. (1984) gewählt. In Anlehnung an die Methoden der Gentechnologie mit Bakterien versuchten sie, fremde Gene über Plasmide, die in Liposomen eingeschleust wurden, in Mäuseblastozysten zu übertragen. Von 80 behandelten und anschließend übertragenen Embryonen entwickelten sich 24 bis zur Geburt. Eine Expression der übertragenen Gene konnte aber nicht sicher nachgewiesen werden. Über die gleichzeitige Injektion mehrerer Gene berichten RUSCONI und KÖHLER (1985), das verwendete Plasmid enthielt 3 verschiedene Gene, von zwei dieser Gene konnte Expression nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Expression in der F₁-Generation größer als bei dem transgenischen Elterntier.

In neuerer Zeit gibt es auch Berichte über Versuche zur Geninjektion bei landwirtschaftlichen Nutztieren. So gelang es LOHSE et al. (1985) nach Vorkerndarstellung durch Zentrifugation fremde DNS in die Vorkerne von Rinderzygoten zu injizieren. Bereits nach 24-stündiger in vitro Kultur konnten sie die Expression des fremden Gens nachweisen. Allerdings ist dies noch kein Beweis für die Integration ins Genom.

Die Erzeugung transgener Schweine gelang erstmals HAMMER et al. (1985). Ebenfalls nach Vorkerndarstellung durch Zentrifugation konnten sie ein Genkonstrukt aus dem Metallothionein-Promotor der Maus und dem humanem Wachstumshormogen in das Genom einbringen. Aus 2035 übertragenen Embryonen (316 Einzeller, 1719 Zweizeller) wurden 192 Ferkel geboren. Bei 20 Ferkeln konnte die Integration des Gens nachgewiesen werden, 11 davon hatten meßbare Serumgehalte an humanem Wachstumshormon. Vergleichbare Ergebnisse erzielten sie nach Mikroinjektion von Kaninchenzygoten, hier hatten 12,8% der geborenen Tiere das Gen integriert.

Weitaus geringere Integrationsraten wurden beim Schaf erzielt. Von 73 geborenen Lämmern hatte lediglich eines das übertragene Gen integriert. Auch BREM et al. (1985) berichten über erfolgreiche Versuche zur Erzeugung transgener Säugetiere. Sowohl bei Mäusen und Kaninchen als auch beim Schwein konnte der Nachweis der Integration des übertragenen Gens erbracht werden. Aus 268 übertragenen Schweinezygoten wurden 15 Ferkel geboren, bei einem dieser Tiere konnte die Integration nachgewiesen werden.

Was nun den Einsatz dieser neuen Technik für tierzüchterische Belange betrifft, so werden auch hier große Hoffnungen im Zusammenhang mit dem Wachstumshormonen gehegt, da Untersuchungen zeigten, daß exogen zugeführtes Wachstumshormon die Milchleistung bei Kühen steigern kann, PEEL et al. (1981) und bei Schweinen ein um 10% besseres Masterergebnis möglich ist, CHUNG et al. (1985)

In der Diskussion stehen auch Gene, die spezifisch sind für Krankheitsresistenz und Gene die die Empfänglichkeit des Organismus gegenüber Parasiten herabsetzen, WAGNER et al. (1984). Ebenso werden das Wollkeratingen, das Hornlosigkeitgen und das sogenannte Booroola-Gen, das die Fruchtbarkeit bei Schafen beeinflußt, in Betracht gezogen, LOVELL-BADGE (1985).

Völlig neue Produktionsverfahren für Proteohormone und andere Proteine können erwartet werden, wenn es gelingt, entsprechende Gene gezielt in das Genom landwirtschaftlicher Nutztiere einzubringen, KARG (1985). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß eukaryotische Zellen aufgrund ihres Enzymmusters die Fähigkeit haben, bestimmte Verbindungen, wie z.B. Glykoproteine, zu bilden, die in Bakterien nicht produziert werden können. Besonders effektiv könnte die Herstellung von Proteinen werden, wenn es gelingt, das besonders leistungsfähige Proteinsynthesesystem des Euters genetisch so zu programmieren, daß statt des Kaseins andere Proteine gebildet werden, KRÄUSSLICH (1985).

Das Hauptproblem wird jedoch sein, diese Gene so zu steuern, daß die gewünschten Produkte zur richtigen Zeit, im richtigen Organ und in einem vernünftigen Maß gebildet werden, MARKERT (1984).

Die Möglichkeiten der Genommanipulation durch Austausch von Vorkernen zwischen befruchteten Eizellen, ILLMENSEE und HOPPE (1981) und die zusätzliche Injektion eines Spermiums nach Herausnahme des weiblichen Vorkerns, MARKERT (1984) sind noch nicht genügend erforscht um in der Tierzucht eingesetzt zu werden. Einige Untersuchungen lassen die Erfolgsaussichten dieser Techniken gering erscheinen, SURANI und BARTON (1983), MC GRATH und SOLTER (1984).

3. Material

Die Versuche wurden am Lehr- und Versuchsgut der Universität München in Oberschleißheim und am Lehrstuhl für Tierhygiene am Oberwiesenfeld in München im Zeitraum von August 1984 bis Januar 1985 durchgeführt. Als Versuchstiere dienten ausschließlich präpuberale Jungsauen der Deutschen Landrasse. Die Tiere hatten ein Gewicht zwischen 75 und 85 kg. Sie wurden in beiden Betrieben aus gemischten Mastgruppen ausgewählt, die auf Vollspaltenböden gehalten wurden. Die Fütterung der Tiere erfolgte mit einem selbstgemischten Kraftfutter aus Automaten. An dem für die Stimulation vorgesehenen Tag wurden die Tiere nach Gewicht ausgewählt und in Einzelhaltung umgestellt. Am Lehr- und Versuchsgut wurden die Tiere in Kastenständen, am Oberwiesenfeld in Schultergurtanbindehaltung aufgestellt. Insgesamt wurden 111 präpuberale Jungsauen ausgewählt und vorbereitet, davon 75 als Spender und 36 als Empfänger-tiere. In der Tabelle 4 sind die wichtigsten Materialdaten zusammengefaßt.

Tabelle 4: Materialübersicht

Anzahl Spender- und Empfängertiere

	Lehr- und Versuchsgut	Oberwiesenfeld
Tiere gesamt	44	67
Spender	32	43
Empfänger	12	24
Haltung	Kastenstände	Anbindehaltung

4. Methoden

Stimulierung und künstliche Besamung

Durch die Verwendung präpuberaler Jungsauen sowohl als Spender als auch als Empfängertiere war zur Synchronisation keine Zyklusblockade notwendig, da bei diesen Tieren die gleichzeitige Verabreichung von PMSG zum Zyklusstart ausreicht. Die Tiere wurden immer am frühen Morgen in die Einzelboxen umgestellt. Die Umstellung sollte die Rauscheauslösung unterstützen, außerdem sind die Tiere für die nachfolgenden Injektionen und Besamungen in Einzelhaltung leichter zu handhaben. Spendertiere erhielten zur Auslösung einer Superovulation zwischen 1000 I.E. und 1250 I.E. PMSG. Die Empfängertiere, bei denen lediglich eine normale Rausche ausgelöst werden sollte, erhielten zwischen 750 I.E. und 900 I.E. PMSG. 72 Stunden nach der PMSG-Injektion erhielten alle Tiere einheitlich 600 I.E. hCG (Ekluton^(R)) zur Ovulationsauslösung und -synchronisation. Die Empfänger der Kontrollgruppe wurden synchron zu den Spendern vorbereitet, wogegen die Empfänger der Versuchsgruppe um 12 Stunden asynchron zu den Spendern vorbereitet wurden, d.h. die PMSG- und hCG- Injektion erfolgte jeweils 12 Stunden später. Dadurch sollten mögliche Entwicklungsverzögerungen, die durch den Zentrifugiertvorgang bedingt sein könnten, ausgeglichen werden.

Die Besamungen wurden 24 und 36 Stunden nach der hCG-Injektion durchgeführt. Das Sperma wurde von einer Besamungstation in 100 ml Plastikschläuchen bezogen, die Besamungsdosis betrug 4 Milliarden Spermien. Zur Insemination wurden Einmalkatheter (Fa. Minitüb) verwendet. Vor jeder Besamung wurde die Ausprägung der Rauschesymptome beurteilt. Zur besseren Beurteilung des Duldungsreflexes wurde ein Ebergeruchsspray (Crestax^(R)) eingesetzt.

Bei den Empfängertieren wurde ebenfalls eine Rauschebeobachtung durchgeführt. Die Ergebnisse der Rauschebeobachtung wurden bei der Planung der Operationsreihenfolge berücksichtigt, da man davon ausgehen kann, daß eine ausgeprägte Rausche ein gutes Kriterium für die Ovarreaktion ist. Das Schema der Stimulierung ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Vorbereitungsschema zur Gewinnung und zum Transfer von Schweinezygoten

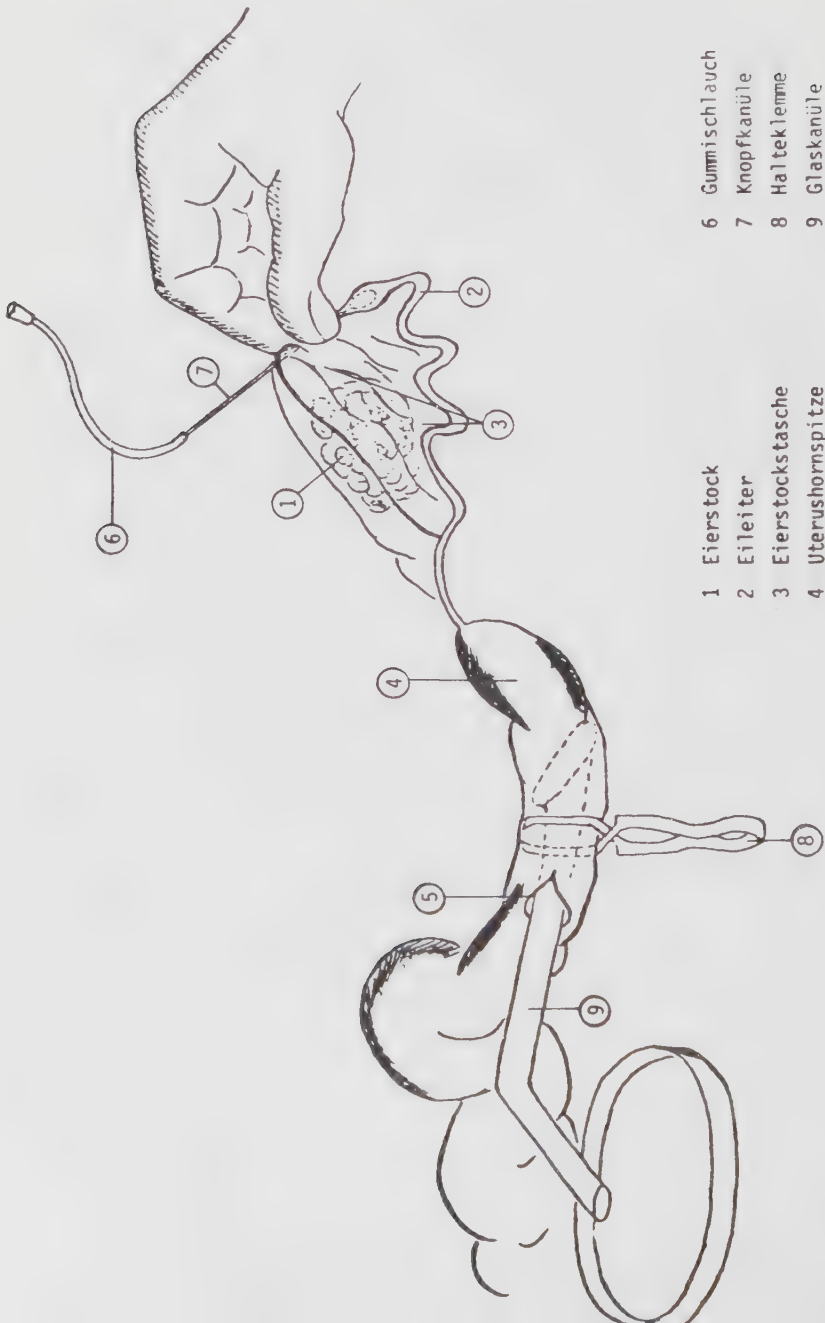
Zeit in h	Präparat	Spender	Empfänger Kontrollgruppe	Empfänger Versuchsgruppe
0	PMSG	1000-1250 I.E.	750-900 I.E.	
12	PMSG			750-900 I.E.
72	hCG	600 I.E.	600 I.E.	
84	hCG			600 I.E.
96		1.Besamung	Rauschekontrolle	
108		2.Besamung	"	
130 - 134		Embryogewinnung	-----	
136			Transfer	Transfer

Embryogewinnung und -beurteilung

24 Stunden vor dem geplanten Operationstermin wurden die Tiere zum letzten Mal gefüttert. Die Narkose wurde durch Kombinationsanästhesie mit Azaperon (Stresnil^(R)) 2mg/kg KGW und Methomidat (Hypnodil^(R)) 4 mg/kg KGW als Initialdosis eingeleitet. Die beiden Präparate wurden mit der Mischspritze intravenös verabreicht. Während der Operation wurde die Narkose durch alleinige Injektion von Methomidat weitergeführt. Nach der Narkoseeinleitung wurden die Tiere durch Waschen, Rasieren und Desinfizieren des Operationsfeldes auf die Operation vorbereitet.

Zur Embryogewinnung wurden die Tiere in Rückenlage festgebunden. Das Operationsfeld wurde zunächst mit einer sterilen, selbstklebenden Inzisionsfolie (60 cm x 35 cm) abgedeckt, anschließend wurde das ganze Tier mit einem Operationstuch abgedeckt. Die Bauchhöhle wurde in der linea alba zwischen den letzten beiden Zitzenpaaren durch einen ca. 15 cm langen Schnitt geöffnet, und ein Uterushorn mit gleichseitigem Ovar aus der Operationswunde vorgelagert. Etwa 10 cm von der uterotubalen Verbindung entfernt wurde das Uterushorn durch einen kleinen Längsschnitt gegenüber dem Mesometrium eröffnet, durch diese Wunde wurde nun eine spezielle Glaskanüle (siehe Abb. 1) in den Uterus eingeführt und mit einer Klemme (siehe Abb. 1) befestigt. Durch die Konstruktion der Glaskanüle ist gewährleistet, daß keine Spülflüssigkeit verlorengeht. Anschließend wurde eine mit einem Gummischlauch verbundene Knopfkanüle über den Fimbrientrichter etwa 5 cm weit in den Eileiter eingeführt und dort mit Daumen und Zeigefinger fixiert. Mit einer auf den Gummischlauch aufgesetzten Spritze wurden nun ca. 50 ml der auf 38° C erwärmten Spülflüssigkeit (PBS; pH 7,2; 320 mosmol mit 300 000 I.E. Penicillin und 300 mg Streptomycin pro Liter) durch den Eileiter in den Uterus gepreßt. Die Spülflüssigkeit konnte über die Glaskanüle in eine Petrischale ablaufen. Durch Ausstreifen der im Uterus verbliebenen Flüssigkeit wurde die Embryogewinnung abgeschlossen.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ausspültechnik



Im Anschluß an die Embryogewinnung wurde die Ovarreaktion durch Zählung der Ovulationspunkte beurteilt und protokolliert. Der Uterusschnitt wurde mit einer fortlaufenden, einstülpenden Naht mit dünnem Catgut verschlossen. Der Verschuß der Bauchdecke erfolgte durch eine fortlaufende Naht, die Peritoneum und Muskulatur erfaßte, und die abschließende Hautnaht, für beide Nähte wurde Chromcatgut verwendet. War das subcutane Fett sehr dick, wurden noch 2-3 subcutane Einzelhefte zur Seromprophylaxe gelegt. Sofort nach der Operation wurden die Tiere parenteral mit Antibiotika versorgt.

Die Petrischale wurde sofort auf eine mit dem Mikroskop verbundene Wärmeplatte gebracht. Die Spülflüssigkeit wurde unter einem Stereomikroskop bei 12-facher Vergrößerung durchgemustert. Die gefundenen Embryonen wurden dann sofort in frisches Kulturmedium (PBS mit Zusatz von 20% Lammserum) umgesetzt, um eine Schädigung der Embryonen durch mögliche Kontamination der Spülflüssigkeit zu vermeiden.

Danach wurden die Embryonen unter dem Mikroskop bei 50-facher Vergrößerung nach Entwicklungsstand und nach morphologischen Kriterien beurteilt. Eizellen, die keine Spermien in der Zona pellucida hatten oder bei denen keine zwei Polkörperchen sichtbar waren, wurden als "nicht befruchtet" eingestuft. Ebenfalls in diese Gruppe wurden Embryonen mit Degenerationserscheinungen eingereiht. Aus der Beurteilung ergaben sich folgende 4 Gruppen:

- 1) Unbefruchtete Eizellen
und Einzeller mit Degenerationen
- 2) Einzeller
- 3) Zweizeller
- 4) Vierzeller

Embryotransfer

Das operative Vorgehen erfolgte analog zur Embryogewinnung. Nachdem ein Ovar vorgelagert war, wurde zunächst die Ovarreaktion beurteilt.

Für den Transfer wurden nur Tiere verwendet, die mindestens 8 corpora rubra hatten. Die Embryonen im Einzellstadium wurden anfangs in den Uterus, später ausschließlich in den Eileiter übertragen. Zum Transfer in den Uterus wurde ein dünner, steriler Plastikkatheter (Katzenkatheter, 1,2 mm Außendurchmesser) nach Punktion des Eileiters in diesen eingeführt und anschließend bis in die Uterushornspitze vorgeschoben. Zur Übertragung in den Eileiter wurde eine dünne, polierte, vorne abgerundete Glaskanüle (Außendurchmesser ca. 1,5 mm) über den Fimbrientrichter in den Eileiter eingeführt und während des Transfers mit Daumen und Zeigefinger fixiert. In beiden Fällen waren die Embryonen in 0,1 ml PBS mit 20% Lammserum aufgezogen und wurden durch Druck auf eine mit dem Plastikkatheter oder der Glaskanüle verbundenen Tuberkulinspritze im Uterus bzw. Eileiter abgesetzt.

Das Aufziehen der Embryonen wurde erst unmittelbar vor dem eigentlichen Transfer, also nach Öffnen der Bauchhöhle und Vorlagerung eines Ovars, durchgeführt, um eine Schädigung der Embryonen durch Temperaturabfall zu vermeiden. Die Embryonen wurden jeweils nur in einen Eileiter übertragen. Bei der Operation der Empfängertiere wurde ganz besonders darauf geachtet, die inneren Organe so schonend wie möglich zu behandeln, notwendige Manipulationen am Reproduktionstrakt wurden so schonend wie irgend möglich ausgeführt. Alle exponierten Organteile wurden laufend mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt, um Verklebungen zu vermeiden.

Die Empfängertiere wurden nach der Operation weiterhin in Einzelhaltung aufgestellt. Ca. am Tag 30, 40 und 50 nach Transfer wurden die Tiere mit einem Ultraschallgerät auf Trächtigkeit untersucht. Tiere bei denen auch nach der dritten Untersuchung keine Trächtigkeit festgestellt werden konnte, wurden anschließend unter Kontrolle geschlachtet. Trächtige Tiere blieben bis zum Abferkeln im Betrieb, sie wurden kurz vor dem errechneten Geburtstermin in Abferkelboxen umgestellt.

Vorkerndarstellung:

Um die Vorkerne bei den Zygoten darzustellen, wurde in einem Vorversuch mit einer Zentrifugenzeit von 2 Minuten begonnen. Im Hauptversuch wurde dann die Zentrifugationsdauer auf 3 Minuten erhöht. Für die

Versuche wurde eine Eppendorf-Zentrifuge verwendet, die eine Zentrifugation bei 15 000 g ermöglicht. Diese wurde, um eine Schädigung der Zygoten durch einen Temperaturschock zu vermeiden, für einige Stunden im Brutschrank auf 35⁰ C erwärmt.

Als Zentrifugengefäße wurden Eppendorf-Röhrchen aus Plastik mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml verwendet. Jeweils 20 Embryonen wurden in einem Milliliter Kulturmedium (PBS mit 20% Lammserum) in ein Röhrchen gebracht. Nach beendeter Zentrifugation wurden die Zygoten sofort aus der Zentrifuge genommen, wiederum um Temperaturschädigungen, die durch Aufheizen der Zentrifuge durch die Wärmeabgabe des Zentrifugenmotors zustande kommen können, zu vermeiden. Durch mehrmaliges Ausspülen der Zentrifugenröhrchen mit Kulturmedium wurden die Embryonen wieder in kleine Petrischalen überführt und einem Umkehrmikroskop (Leitz-Diavert) bei 250-facher Vergrößerung auf sichtbare Vorkerne und morphologisch untersucht.

Bei der morphologischen Beurteilung wurden die Zygoten in "transfer-tauglich" und "nicht transfertauglich" eingeteilt. Als "nicht transfer-tauglich" wurden Zygoten klassifiziert, die durch die Zentrifugation zerstört worden waren. Zygoten, deren Zellmembran geplatzt war und dadurch bedingt ein pilzartiges Austreten des Zytoplasmas in den perivitellinen Raum zeigten, wurden in diese Gruppe eingeteilt.

In vitro Kultivierung

Die Versuche zur in vitro Kultivierung von Einzellern wurden in PBS und BMOC-2 durchgeführt. Es wurden nur industriell konfektionierte und entsprechend kontrollierte Flüssigmedien verwendet. In beiden Kulturmedien wurde der pH-Wert auf 7,2 eingestellt, die Osmolarität betrug 320 mosmol. Im Brutschrank wurde eine Temperatur von 37,5⁰ C aufrechterhalten. Als Kulturgefäße für PBS dienten verschraubbare Glasröhrchen (1,2 x 3,6 mm), die maximal gefüllt waren um einem pH-Wert-Abfall bzw. Konzentrationsänderungen vorzubeugen. Da BMOC-2 einen Bicarbonatpuffer enthält und daher mit der umgebenden CO₂-Atmosphäre in Verbindung stehen muß, wurden für dieses Medium kleine, offene Petrischalen (35 x 10 mm) verwendet. Damit der pH-Wert konstant bei 7,2 bleibt, wurde bei diesem Medium ein Gasgemisch von 5% CO₂ in Luft, bei einer Luftfeuchtigkeit von 100%, verwendet.

In der folgenden Übersicht ist die Zusammensetzung der beiden verwendeten Medien zusammengefaßt.

Übersicht 1: Medienzusammensetzung in mg/l

Komponente	PBS	BMOC-2
NaCl	8000	5546
KCl	200	356
CaCl ₂	100	189
Na ₂ HPO ₄	1150	-
KH ₂ PO ₄	200	162
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	294
NaHCO ₃	-	2106

Für die in vitro Kultur wurde den Kulturmedien 300 000 I.E. Penicillin, 300 mg Streptomycin pro Liter und 20% Lammserum zugesetzt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Medien durch Sterilfiltration (Minisart^(R), Porengröße 0,2 µ) sterilisiert.

Die Embryonen einer Sau wurden alle in dem gleichen Glasröhrchen bzw. derselben Petrischale kultiviert. Die Kulturen wurden nach 24 und 48 Stunden auf Weiterentwicklung untersucht, die Differenz zum vorigen Tag wurde ausgezählt und protokolliert. Die Beurteilung der Embryonen wurde unter einem Stereomikroskop bei 50-facher Vergrößerung vorgenommen, bei den mit BMOC-2 beschickten Petrischalen wurde die Beobachtungszeit möglichst kurz gehalten, um einem Abfall des pH-Wertes durch CO_2 -Abgabe an die umgebende Luft vorzubeugen. Die Kulturgefäße für PBS wurden zur Beurteilung in kleine Petrischalen entleert, da eine Beurteilung in den Glasgefäßen nicht möglich war. Durch die mit dem Mikroskop verbundene Wärmeplatte wurde Temperaturkonstanz während der Beurteilung gewährleistet. Während der gesamten Kulturdauer wurde kein Medienwechsel vorgenommen.

5. Ergebnisse eigener Untersuchungen

5.1. Embryogewinnung beim Schwein

5.1.1. Superovulation

Im Rahmen der Voruntersuchungen zur Erzeugung von transgenen Schweinen wurden 75 Tiere stimuliert, davon konnten von 66 Spendertieren Embryonen gewonnen werden, 12% der Tiere zeigten keine Reaktion auf die Stimulierung. Die Ergebnisse der Superovulation werden in Tabelle 6 aufgezeigt, gleichzeitig ist in dieser Tabelle die Dosisabhängigkeit des Superovulationserfolges dargestellt.

Tabelle 6: Superovulationsergebnisse in Abhängigkeit von der Stimulierungsdosis

PMSG - Dosierung	Anzahl Tiere	$\bar{x}$	Minimum	Maximum
1000 I.E.	32	28,7	7	77
1100 I.E.	13	42,5	6	124
1250 I.E.	21	42,7	4	124
Gesamt	66	35,8	4	124

Zwischen PMSG-Dosierung und der Anzahl der gewonnenen Embryonen besteht eine nur lose Beziehung mit $r = 0,24$, die statistisch auf dem 5% Niveau abgesichert werden konnte. Dieses bestätigt Literaturangaben, wo in dem verwendeten Dosisbereich ebenfalls eine lineare Beziehung gefunden wurde, jedoch ebenfalls mit stark unterschiedlicher Reaktion innerhalb einzelner Dosisgruppen. Tabelle 7 zeigt die Embryogewinnungsraten in Abhängigkeit von den gewählten Dosierungen.

Tabelle 7: Embryogewinnungsergebnisse

Anzahl Embryonen	1000 I.E. PMSG n = 32 Tiere		1100 I.E. PMSG n = 13 Tiere		1250 I.E. PMSG n = 21 Tiere	
	Anzahl Tiere	% kum.	Anzahl Tiere	% kum.	Anzahl Tiere	% kum.
<5	-	-	-	-	1	4,8
-10	7	21,9	2	15,4	-	-
-15	4	34,4	1	23,1	-	-
-20	4	46,9	-	-	5	28,6
-25	2	53,1	1	30,8	-	-
-30	2	59,4	1	38,5	1	33,3
-35	3	68,8	-	-	1	38,1
-40	3	78,1	1	46,2	3	52,4
-45	1	81,3	1	53,8	5	76,2
-50	1	84,4	2	69,2	-	-
-55	-	-	1	76,9	1	81,0
-60	1	87,5	1	84,6	1	85,7
>60	4	100,0	2	100,0	3	100,0

Zieht man die Grenze für eine erfolgreiche Superovulation bei 15 gewonnenen Embryonen, hatten in der Gruppe mit 1000 I.E. PMSG 65,6%, in der Gruppe mit 1100 I.E. PMSG 76,9% und in der Gruppe mit 1250 I.E. PMSG sogar 95,2% im Sinne einer Superovulation reagiert.

5.1.2. Embryogewinnung

Um eine Beurteilung der Effektivität der Spültechnik machen zu können, wurden am Anfang des Versuches 16 Tiere, bei denen jeweils 18 oder weniger corpora hämorrhagica gezählt wurden, für die Berechnung der Ausspülrates ausgewählt. Auf dieser Grundlage wurde eine Ausspülrates von 90,1% ermittelt. Sie liegt damit in dem Bereich, der auch von anderen Autoren für diesen Gewinnungszeitraum angegeben wird. Bei Tieren, die eine höhere Ovulationsrate aufwiesen, war die Zählgenauigkeit unbefriedigend, das heißt es wurden in aller Regel mehr Embryonen gewonnen als corpora rubra gezählt wurden. Dies wird auch von anderen Tierarten berichtet. Die Zählgenauigkeit könnte nur durch einen hohen Zeitaufwand, der natürlich auch das narkotisierte Tier erheblich belasten würde, verbessert werden.

Der Zeitpunkt der Embryogewinnung wurde mit 60-64 Stunden nach der hCG-Gabe so gewählt, daß der Befruchtungsvorgang abgeschlossen war und daß möglichst viele Zygoten gewonnen werden konnten. In der Tabelle 7 sind die Entwicklungsstadien in Abhängigkeit von dem Zeitraum zwischen hCG-Injektion und Gewinnungszeitpunkt dargestellt.

Tabelle 8: Entwicklungsstadien in Abhängigkeit vom Gewinnungszeitpunkt

Entwicklungsstadium	60-62 h nach hCG	62-64 h nach hCG
	n = 35 Tiere	n = 31 Tiere
Einzeller	85,1%	76,3%
Zweizeller	13,3%	13,8%
Vierzeller	1,6%	9,9%

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß 62 Stunden nach der hCG-Injektion der Anteil an weiterentwickelten Stadien deutlich zunimmt. Bemerkenswert ist vor allem die Tatsache, daß der Anteil an Zweizellern praktisch gleich bleibt, während der Anteil an Vierzellern sich versechsfacht. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte in der kurzen Dauer des Zweizellstadiums und in dem nicht absolut synchronen Ovulationsverlauf zu suchen sein.

Die Qualität bzw. der Entwicklungsstand aller gewonnenen Embryonen, die nach den auf Seite 37 angeführten Kriterien beurteilt wurden, ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Qualität und Entwicklungsstand der gewonnenen Embryonen

n = 66 Tiere mit 35,8 SD:25,9 Embryonen

	Eizellen	Einzeller	Zweizeller	Vierzeller
absolut	7,7	21,2	4,8	2,1
prozentual	21,5 %	59,3 %	13,5 %	5,7 %

Wie Tabelle 9 zeigt, war der Anteil an unbefruchteten Eizellen mit 21,5% relativ hoch, möglicherweise ist dieser Anteil wegen der doch sehr hohen Ovulationsraten auf die Ovulation unreifer Eizellen zurückzuführen.

5.2. In vitro Kultivierung

Um die Kulturbedingungen für frühe Embryonalstadien zu prüfen, wurden Ein-, Zwei- und Vierzeller in zwei verschiedenen Medien für jeweils 24 bis 48 Stunden kultiviert. Insgesamt wurden 348 Einzeller, 20 Zweizeller und 36 Vierzeller in PBS und 68 Einzeller, 33 Zweizeller und 35 Vierzeller in BMOC-2 kultiviert. Die Ergebnisse der in vitro Kultur sind in Tabelle 10 aufgezeigt.

Tabelle 10: Kulturergebnisse in zwei verschiedenen Kulturmedien

Kulturmedium	Kulturdauer	Entwicklungsstadium			
		1- Zeller	2- Zeller	3-4- Zeller	5-8- Zeller
PBS	-	348	20	36	-
	24 h	309	49	46	-
BMOC-2	-	68	33	35	-
	24 h	45	20	56	15

Es konnte eine sehr geringe Weiterentwicklung in PBS und eine etwas bessere, wenn auch nicht befriedigende Weiterentwicklung in BMOC-2 festgestellt werden. Immerhin entwickelten sich einige Embryonen in BMOC-2 über das Vierzellstadium hinaus. Die Kulturergebnisse können Literaturangaben bestätigen, wonach es sehr schwierig ist, Schweineembryonen im Ein- und Zweizellstadium über längere Zeit zu kultivieren, und kaum Weiterentwicklung zu beobachten ist.

5.3. Vorkerndarstellung:

Die Darstellungsrate, die als Quotient von Zygoten mit einem oder zwei sichtbaren Vorkernen zur Gesamtzahl der zentrifugierten Zygoten berechnet wurde diente zur Bewertung des Zentrifugationserfolgs. Es wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den beiden Zentrifugationszeiten gefunden. Während bei 2-minütiger Zentrifugation nur eine Darstellungsrate von 34% erzielt werden konnte, lag die Darstellungsrate mit 76% nach 3-minütiger Zentrifugation deutlich höher. Deshalb wurden die Embryonen für den Transfer ausschließlich 3 Minuten lang zentrifugiert. Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Zentrifugation zu entnehmen.

Tabelle 11: Zentrifugationsergebnisse

	Zentrifugationsdauer	
	2 Minuten	3 Minuten
Anzahl zentrifugierter Zygoten	61	301
1 Vorkern sichtbar	18	140
2 Vorkerne sichtbar	3	229
Darstellungsrate	34%	76%

Um die Möglichkeit der Kerndarstellung bei Zweizellern durch Zentrifugation zu prüfen wurden auch 63 Zweizeller 3 Minuten lang zentrifugiert. Bei 25 konnte jeweils ein Kern, bei 26 sogar beide Kerne dargestellt werden. Dies entspricht einer Darstellungsrate von 80%.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen zentrifugierter Schweinezygoten.

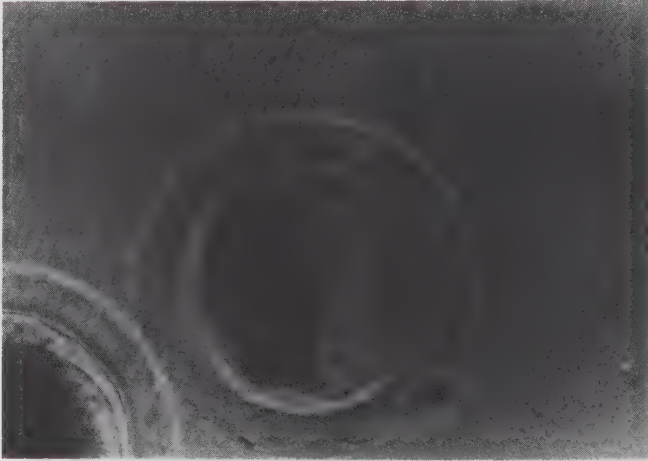


Abbildung 2: Zentrifugierte Schweinezygote mit zwei Vorkernen
Aufnahme bei 250-facher Vergrößerung

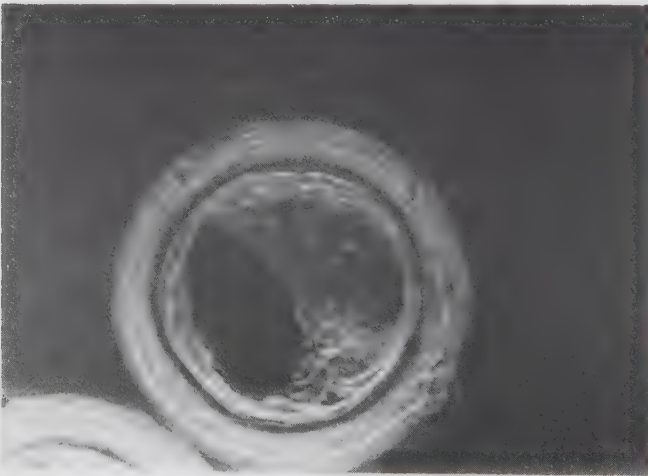


Abbildung 3: Zentrifugierte Schweinezygote mit zwei Vorkernen
Aufnahme bei 250-facher Vergrößerung (Phasenkontrast)

5.4. Transfer

Bei der Durchführung des Embryotransfers wurden in der Versuchsgruppe ausschließlich zentrifugierte Einzeller übertragen. Nach dem gleichen Schema gewonnene Zygoten wurden ohne zusätzliche Manipulationen auf Empfänger der Kontrollgruppe übertragen. Am Anfang der Versuche wurden die Zygoten in den Uterus, später in den Eileiter übertragen.

Im ersten Versuchsansatz (Transfer in den Uterus) wurden 4 Transfers in der Versuchsgruppe und ein Transfer in der Kontrollgruppe durchgeführt. Daraus resultierte nur eine Trächtigkeit in der Versuchsgruppe, dieses Tier mußte am Tag 56 der Trächtigkeit wegen Beinschwäche geschlachtet werden. Bei der Schlachtung wurden 3 normal entwickelte Feten gewonnen.

In der zweiten Versuchsreihe wurden in jeder Gruppe 9 Transfers durchgeführt, dabei wurden insgesamt 368 Zygoten übertragen. In beiden Gruppen waren 7 Tiere trächtig, dies entspricht einer Trächtigkeitsrate von 77,8%. Während der Gravidität fiel in jeder Gruppe ein Tier aus, in der Versuchsgruppe mußte ein Tier wegen Beinschwäche am Tag 55 der Trächtigkeit geschlachtet werden, der bei der Schlachtung gewonnene Uterus enthielt 10 normal entwickelte Feten. Der vorzeitige Ausfall dieses Empfängers war wohl durch während der Aufzuchtphase auf Spaltenboden erworbene Schäden bedingt. In der Kontrollgruppe verwarf ein Tier am Tag 80 der Gravidität, die pathologische Untersuchung der 7 Feten und der Nachgeburtssteile ergab keinen Hinweis auf die Abortursache. Somit ferkelten aus jeder Gruppe 6 Schweine ab. In der Tabelle 12 sind die Transfergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle 12: Transferergebnisse (Übertragung in den Eileiter)

	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	Gesamt
Anzahl der Transfers	9	9	18
Trächtigkeitsrate	77,8% (7)	77,8% (7)	77,8% (14)
Anz. Zygoten übertragen	190	178	368
Anz. Zygoten/Empfänger	21,1 +/- 4,0 *	19,8 +/- 3,7 *	20,4 +/- 3,8 *
Anz. Zygoten/trächtige Empfänger	20,1 +/- 3,6 *	20,5 +/- 3,9 *	20,4 +/- 3,6 *

* x +/- SD

Die Trächtigkeitsrate war in beiden Gruppen gleich. Auch die Anzahl der übertragenen Embryonen unterscheidet sich kaum in den beiden Gruppen. Aus den oben angeführten Transferdaten ergaben sich die in Tabelle 13 zusammengestellten Abferkelergebnisse.

Tabelle 13: Abferkelergebnisse (Übertragung in den Eileiter)

	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	Gesamt
trächtige Empfänger	7	7	14
Abferkelungen	6	6	12
Anzahl der Ferkel	38	34	72
Ferkel pro Sau	6,3 +/- 2,9 [*]	5,7 +/- 3,9 [*]	6,0 +/- 3,3 [*]
Wurfgrößen	4 - 11	1 - 11	1 - 11
Embryo- Überlebensrate I	32,2%	26,4%	29,4%
Embryo- Überlebensrate II	34,0%	28,4%	31,2%

* x +/- SD

Die Embryoüberlebensrate I bezieht sich auf ausgetragene Würfe, bei der Berechnung der Embryoüberlebensrate II wurden auch abortierte bzw. bei der Schlachtung gewonnene Feten miteinbezogen.

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, wurden von 12 Empfängern 72 Ferkel geboren, davon 38 aus 118 zentrifugierten Zygoten und 34 aus 127 un- behandelten Zygoten. Die durchschnittliche Wurfgröße lag bei 6,0 Fer- keln pro Sau. Die Wurfgröße war in der Versuchsgruppe etwas höher als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant. Läßt man das Tier mit nur einem Ferkel in der Kontrollgruppe außer acht, so sind die Wurf- größen in beiden Gruppen gleich. Die Embryoüberlebensraten bei den trächtigen Empfängern schwankte zwischen 18% und 61% in der Versuchs- gruppe und zwischen 5,5% und 44% in der Kontrollgruppe. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte kein Einfluß der Zahl der übertragenen Zygoten auf die Embryoüberlebensrate festgestellt werden.

6. Diskussion

Superovulation

Um die Ergebnisse des Superovulationserfolges bei präpuberalen Jungsauen werten zu können, ist man darauf angewiesen, sie mit der physiologischen Ovulationsrate von geschlechtsreifen Jungsauen, die mit 10 -14 angegeben wird, zu vergleichen. Man sollte alle Ovulationsraten, die über diesem Bereich liegen, als Superovulation bezeichnen. Da sich im eigenen Versuch die Ergebnisse auf die Anzahl der gewonnenen Embryonen beziehen, wurden zum Vergleich nur Autoren herangezogen, die außer der Bestimmung der Ovulationsrate auch noch eine Embryogewinnung durchführten. Im Vergleich mit diesen Autoren liegen die erzielten Ergebnisse (Tabelle 6) sowohl in der Gruppe mit 1000 I.E. PMSG (28,7 Embryonen) als auch in den beiden Gruppen mit 1100 I.E. PMSG (42,5) und 1250 I.E. PMSG (42,7) deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten. So gewannen BAKER und COGGINS (1968) 16,6 Embryonen bei 1000 I.E. und 32,3 Embryonen bei 2000 I.E. PMSG. Auch SCHLIEPER (1983) erzielte bei Kombination von PMSG und hCG in Höhe von 800/400 bzw. 1200/600 nur Ergebnisse, die mit 1000 I.E. PMSG im eigenen Versuch vergleichbar sind.

Besonders bemerkenswert erscheint die Tatsache, daß sowohl in der Gruppe mit 1100 I.E. PMSG als auch in der Gruppe mit 1250 I.E. PMSG von jeweils einem Tier 124 Embryonen gewonnen werden konnten. Derartig hohe Ovulationsraten sind bisher in der Literatur nicht beschrieben, lediglich SCHLIEPER (1983) konnte bei einem Tier 111 Ovulationen beobachten.

Nach den eigenen Ergebnissen können die Beobachtungen BAKER und COGGINS (1968) und GUTHRIE et al. (1974) bestätigt werden, daß der Superovulationserfolg in dem verwendeten Dosisbereich, linear mit der PMSG-Dosis korreliert ist. Es ist jedoch anzunehmen, daß im eigenen Versuch die obere Grenze der möglichen Ovulationsraten fast erreicht wurde.

Die unterschiedlichen Reaktionen dürften sich auf mehrere Ursachen zurückführen lassen, so gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten, wobei es sogar Unterschiede zwischen einzelnen Chargen desselben Präparates geben kann. Diese Beobachtung trifft sowohl für Einzelpräparate, als auch für Kombinationspräparate und hier wohl auch für

die verschiedenen als optimal dargestellten Kombinationen zu. Eine andere Ursache ist in rassespezifischen Unterschieden zu suchen, so sollen Kreuzungstiere in der Regel besser reagieren. Weiterhin können Schwankungen des Superovulationserfolgs durch Umwelteinflüsse und, wie HUNTER (1964) vermutet, durch die individuelle Reaktionsbereitschaft des Einzeltieres auf die Gonadotropinbehandlung bedingt sein. Die Vorausplanung bzw. Vorbereitung von Empfängertieren kann sich also nur nach den in den eigenen Versuchen gewonnenen Durchschnittswerten für bestimmte PMSG-Dosierungen richten.

Die alleinige PMSG Verabreichung, der nach ca. 72 Stunden eine hCG-Injektion folgt, ist als Methode der Wahl anzusehen. Die alleinige Gabe von PMSG bzw. PMSG/hCG-Kombinationen ist für Embryotransferprogramme wohl nicht geeignet, da einerseits keine Synchronisation der Ovulationen erfolgt und andererseits mit einem erhöhten Anteil an nicht ovulierten Follikeln zu rechnen ist. Die Stimulierung mit PMSG/hCG-Kombinationen mit einer anschließenden hCG-Gabe wird nur von wenigen Autoren durchgeführt, wahrscheinlich stand bei diesen Versuchen kein geeignetes PMSG-Reinpräparat zur Verfügung.

Über die am eigenen Material festgestellte Variation der Ovarreaktion wird auch in der Literatur berichtet, allerdings sind meist nur kleine Gruppen von Tieren untersucht worden, so daß zufällige Effekte nicht vollständig auszuschließen sind. Die eigenen Untersuchungen zeigen, daß bei einem relativ großen Material die Variation noch beachtlich ist. Daher erscheint es entscheidend die Hormoninjektionen und die Besamungen nach einem genau festgelegten Schema durchzuführen, um zusätzliche Variationen nach Möglichkeit auszuschließen.

Gewinnungszeitpunkt der Embryonen

Da die Gewinnung von Einzellern bisher rein wissenschaftlichen Untersuchungen zur Klärung grundsätzlicher Fragen der Frühembryonalentwicklung diene, liegen relativ wenige Untersuchungen mit kleinen Tierzahlen vor. Da mit der Möglichkeit der Geninjektion auch eine praktische Einsatzmöglichkeit zur Gewinnung und zum Transfer von Einzellern gegeben sein könnte, müssen möglichst einfache und praktikable Lösungen

gefunden werden. Die im eigenen Versuch bei Gewinnung bis 62 Stunden nach der hCG-Injektion erzielten Anteile an Einzellern mit 85,1% sind befriedigend, bei einer Vorverlegung des Gewinnungszeitpunktes steigt die Wahrscheinlichkeit, daß der Befruchtungsvorgang noch nicht vollständig abgeschlossen ist und daher der Anteil an unbefruchteten Eizellen stark zunimmt, BRÜSSOW (1985).

Die gefundenen Entwicklungsstadien stimmen mit den von HUNTER (1974) angegebenen Ergebnissen überein, der erste Teilungsstadien 14-16 Stunden nach der Befruchtung findet, wobei er den Befruchtungszeitpunkt mit 6-8 Stunden nach der Ovulation angibt. Ebenso gewannen BAKER et al. (1967) erste Teilungsstadien etwa 20 Stunden nach der Ovulation. In beiden Versuchen wurde die Spontanovulation mit hCG synchronisiert und der Ovulationszeitpunkt, aufgrund früherer Untersuchungen, mit 40-42 Stunden nach der hCG-Injektion angenommen. Die entsprechenden Intervalle zwischen Embryogewinnung und hCG-Gabe wären also 60-64 Stunden nach hCG bei HUNTER (1974) und etwa 60 Stunden nach hCG bei BAKER et al. (1967).

Vergleichbare Untersuchungen führte STIDL (1978) durch; während 45-55 Stunden nach hCG nur Einzeller gewonnen wurden, dominierte bereits in der 65. Stunde nach hCG das Zweizellstadium. Dies stimmt mit den eigenen Untersuchungen weitgehend überein, wo ab der 62. Stunde nach hCG der Anteil an weiterentwickelten Stadien deutlich anstieg.

Da im eigenen Versuch schon 62 Stunden nach hCG die ersten Vierzeller auftraten, ist zu vermuten, daß die Ovulationen nach PMSG-Stimulierung früher beginnen und sich über einen längeren Zeitraum erstrecken, als bei Spontanovulation. Dies wurde von GUTHRIE et al. (1974) ebenfalls beobachtet.

Nicht bestätigt werden konnten die Ergebnisse von BRÜSSOW (1985), wonach die ersten Teilungsstadien erst 26 Stunden nach der Ovulation, die mit 39 Stunden nach hCG angenommen wurde, auftraten. Allerdings waren die Tiere mit Methallibur vorbehandelt, und die Ovulation wurde bei einem Teil der Tiere mit einer GnRH/hCG-Kombination ausgelöst, so daß aufgrund der unterschiedlichen Vorbehandlung der Tiere kein direkter Vergleich gezogen werden kann.

Ausspülrate

Die in dem Versuch erzielte Ausspülrate ist mit den Literaturangaben für diesen frühen Zeitpunkt vergleichbar, so erzielten VINCENT et al. (1964) bis 48 Stunden nach der Ovulation Ausspülraten von 83%, SMIDT et al. (1965) am Tag nach der Ovulation 90%. In erster Linie wird der Erfolg der Embryogewinnung von der Erfahrung des Operateurs und vom der Zeitpunkt der Spülung abhängen. Wie Untersuchungen an Schlachttieren gezeigt haben werden dort keine höheren Ausspülraten erzielt, SCHLIEPER (1983) und HUNTER (1974).

Qualität der Embryonen

Da die Befruchtungsrate beim Schwein sowohl nach Spontanovulation als auch nach Superovulation in der Regel sehr hoch angegeben wird, HUNTER (1966), ist der Anteil an unbefruchteten Eizellen in der eigenen Untersuchung mit 21,5% relativ hoch. Aber auch von anderen Untersuchern wird darauf hingewiesen, daß bei hohen Ovulationsraten der Anteil an unbefruchteten Eizellen stark ansteigt. So fanden NIEMANN et al. (1983b) bei Ovulationsraten über 30 durchschnittlich 22,6% unbefruchtete und 24,0% degenerierte Eizellen. Bei Ovulationsraten unter 16 lagen die entsprechenden Anteile bei nur 7,4% bzw. 2,2%. Sie erklären dieses Phänomen durch erhöhte Progesteronwerte nach der Superovulation, die einen beschleunigten Eileitertransport zur Folge haben können, so daß die Eizellen auf ein für dieses Entwicklungsstadium ungeeignetes Uterusmilieu treffen. Ähnliche Ergebnisse erzielt SCHLIEPER (1983) bei einem Superovulationsversuch, hier hatten sich bei der Gewinnung der Embryonen 86 Stunden nach der hCG Injektion nur 56,7% - 62,0% weiterentwickelt. Da aber keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Superovulationsgruppen gefunden wurden, dürfte der hohe Anteil an unbefruchteten Eizellen auf den zu früh gewählten Besamungszeitpunkt bei nur einmaliger Besamung zurückzuführen sein.

Die tatsächliche Befruchtung von Eizellen kann sicher nur durch Fixierung und Färbung der Eizellen festgestellt werden, so wird die morphologische Beurteilung von Embryonen besonders im Einzellstadium immer subjektiv bleiben und sehr von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers abhängen.

In vitro Kultivierung

Da im eigenen Versuch keine Erfolge bei der in vitro Kultivierung von Embryonen mit weniger als 4 Blastomeren erzielt werden konnten, können Untersuchungen bestätigt werden, die über geringe Weiterentwicklungsraten bei der Kultur von Zygoten und Zweizellern berichten.

So berichten STIDL (1978), RUNDELL und VINCENT (1969), SCHNEIDER et al. (1975) übereinstimmend von schlechten Ergebnissen bei der in vitro Kultur. Lediglich POPE und DAY (1970) und (1977) berichten über Teilungsraten, wie man sie auch bei der Kultur von Morulae erwarten würde. Sie stellen auch normale Trächtigkeitsraten nach 24-stündiger Kultur fest, aber nach 48-stündiger Kultur war die Trächtigkeitsrate und Embryoüberlebensrate deutlich vermindert. Diese Ergebnisse konnten von anderen Untersuchern jedoch nicht bestätigt werden. Obwohl die Kultivierung von Einzellern bis zur Blastozyste MENINO und WRIGHT (1982) gelang, war der Gesamtanteil der sich weiterentwickelten Einzeller klein. Die im eigenen Versuch erzielten Weiterentwicklungsraten sind mit den Ergebnissen von HERRMANN et al. (1981) und HERRMANN und HOLTZ (1981) vergleichbar. Sie kultivierten ebenfalls Ein- und Zweizeller in PBS. Sie konnten zwar eine gute Weiterentwicklung bis zum Vierzeller feststellen, doch entwickelten sich nur 2,4% bzw. 3,2% der Embryonen über das Vierzellstadium hinaus.

Die Frage, ob bicarbonatgepufferte Medien besser geeignet sind als Phosphatgepufferte, kann sicher nicht abschließend beantwortet werden. Da bei der Kultivierung von Embryonen viele Faktoren eine Rolle spielen, darf bei der Bewertung von Kulturergebnissen nicht nur vom Medium bzw. dem verwendeten Puffer ausgegangen werden. Zudem ist noch ungeklärt, ob es sich bei einer einzigen Teilung wirklich um eine Entwicklung in vitro handelt und nicht wie STIDL (1978) vermutet, um dem Abschluß von in vivo bereits begonnenen Teilungsvorgängen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für diese Entwicklungsstadien noch kein wirklich funktionierendes Kultursystem zur Verfügung steht. Vielleicht bringen neue Medien bzw. Medienzusammensetzungen hier einen Fortschritt. So konnte z.B. STONE et al. (1984) zeigen, daß die Verwendung von Humanserum bessere Ergebnisse bringt als alle bisherigen

Serumzusätze. Immerhin wäre es möglich, daß diese frühen Entwicklungsstadien ganz bestimmte Energie- bzw. Eiweißsubstrate benötigen, wie es von BRINSTER (1965a) für Mäuseembryonen aufgezeigt wurde. Auch Hormonzusätze zum Medium könnten weitere Verbesserungen bringen. So verwenden MEINECKE et al. (1984) Insulin bei der Kultur von Schweine-oocyten, und NIEMANN und ELSAESSER (1983) konnten durch Zusatz von Oestrogen die Kulturergebnisse von Morulae deutlich verbessern.

Ein Ansatzpunkt, um die optimalen Kulturbedingungen für Ein- und Zweizeller aufzuklären, wäre die komplette Untersuchung der Eileiterflüssigkeit. Zur Zeit erscheint es wegen der beschränkten in vitro Kulturmöglichkeiten jedenfalls günstig Ein- und Zweizeller möglichst nicht oder nur sehr kurze Zeit zu kultivieren. Um gute Transferergebnisse zu erreichen, ist eine sofortige Übertragung, sofern möglich, anzustreben. Bei der Mikromanipulation sollte die Kulturdauer ebenfalls so kurz wie möglich gehalten werden, nicht nur wegen der verlängerten Kulturdauer sondern auch wegen möglicher negativer Einflüsse des Lichts. Das bedeutet, daß es anzustreben ist, Embryogewinnung und Mikroinjektion am selben Ort durchzuführen.

Vorkerndarstellung

Da die Methoden der in vivo Vorkerndarstellung bei Nutztierembryonen relativ neu sind, gibt es nur wenige Untersuchungen die sich mit den eigenen Untersuchungen vergleichen lassen. Im Vergleich zur Zentrifugation erscheint die Vorkerndarstellung durch Fluoreszenzmikroskopie relativ aufwendig, die Darstellung gelingt nicht immer, und die Zygoten werden durch die verwendete UV-Strahlung geschädigt bzw. abgetötet.

Die Zentrifugationsmethode wurde bisher bei den Spezies Schaf, Rind und Schwein angewendet, Erfolge wurden nur bei Schwein und Rind erzielt. WALL et al. (1985) zeigen, daß sich zentrifugierte Embryonen bei einer in vivo Kultur über mehrere Tage normal weiterentwickeln. Die Darstellungsrate, die Wall et al. (1985) mit 85% erzielen, liegt über den eigenen Ergebnissen, was darauf zurückzuführen sein könnte, daß im eigenen Material die Befruchtungsrate niedriger war. HAMMER et al. (1985) geben Trächtigkeitsraten von 50% beim Transfer zentrifugierter und mikroinjizierter Schweinezygoten an.

Nach den eigenen Ergebnissen ist es möglich, die Vorkerne durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 15000 g zu einem hohen Prozentsatz darzustellen. Es besteht aber die Schwierigkeit, die Vorkerne unter dem Mikroskop zu sehen, wenn keine Haltepipette zur Verfügung steht, da die Embryonen dazu neigen, sich bedingt durch die Schwerpunktverlagerung nach der Zentrifugation, mit dem die Granula enthaltenden Teil nach oben zu drehen.

Eine dreiminütige Zentrifugationsdauer erscheint für die Vorkerndarstellung bei Schweinezygoten praktikabel. Wurden die Embryonen nur zwei Minuten lang zentrifugiert, waren signifikant weniger Vorkerne sichtbar. In weiteren Versuchen wäre an eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Zentrifugalbeschleunigung zu denken. Möglicherweise bestehen für jede Tierart unterschiedliche, optimale Kombinationen zwischen Zentrifugalbeschleunigung und Zentrifugationsdauer, besonders wenn man daran denkt, daß die Granula bei den einzelnen Tierarten unterschiedlich zusammengesetzt sind, RÜSSE (1978). Bei den eigenen Versuchen erschien es besonders wichtig, durch Erwärmung der Zentrifuge einem Temperaturschock vorzubeugen.

Transfer

Die geringe Trächtigkeitsrate im ersten Versuchsansatz mit nur einer Trächtigkeit aus insgesamt 5 Transfers ist wahrscheinlich technikbedingt, da die Zygoten hier in die Uterushornspitze übertragen wurden. Nach Modifikation der Transfertechnik (Transfer in den Eileiter) wurden höhere Trächtigkeitsraten erzielt. Hieraus läßt sich ableiten, daß für Zygoten nur der Transfer in den Eileiter in Frage kommt.

Die Trächtigkeitsrate liegt mit 77,8% sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe im oberen Bereich der in der Literatur angegebenen Werten. Hier werden Trächtigkeitsraten zwischen 30% HUNTER et al. (1967) nach Transfer von Blastozysten und 100%, POPE et al. (1972) nach Transfer von Morulae angegeben. Bei den sehr umfangreichen Untersuchungen von POLGE (1982) wurden Trächtigkeitsraten von 78% erreicht. Direkte Vergleichsmöglichkeiten fehlen allerdings, da in der Regel weiterentwickelte Stadien übertragen werden, die nach JAMES et al. (1983) aufgrund ihrer geringeren Empfindlichkeit gegen Umwelteinflüsse bessere

Transferergebnisse erbringen. Außerdem ist beim Transfer von Einzellern nicht auszuschließen, daß trotz sorgfältiger Auswahl der Zygoten unfruchtete Eizellen mit übertragen wurden. In der Literatur liegen nur spärliche Angaben über den Transfer von frühen Stadien vor. So übertrugen CURNOCK et al. (1976) 10 Einzellern und 6 Zweizellern auf einen Empfänger, daraus wurden 7 Ferkel geboren, POPE und DAY (1977) erzielten nach Übertragung von 69 Zweizellern auf 6 Empfängertiere eine Trächtigkeitsrate von 83% bei einer Embryoüberlebensrate von 57% am Tag 28 der Gravidität.

Beim Vergleich von Embryotransfererfolgen ist jedoch nicht nur die Trächtigkeitsrate ausschlaggebend, sondern auch die Embryoüberlebensrate, die sich üblicherweise auf trächtige Empfänger bezieht. Allerdings muß man hier unterscheiden zwischen Autoren, die die Empfänger nach 25-30 Tagen schlachten ließen und solchen, die die Empfänger austragen ließen. Obwohl nach POPE und FIRST (1985) der größte Anteil an Embryonalverlusten während der ersten vier Wochen auftritt und bis zu 45% beträgt, ist mit weiteren Verlusten von 10-20% bis zum Geburtstermin zu rechnen. Dies zeigen auch Literaturangaben, denn die für ausgetragene Würfe angegebenen Embryoüberlebensraten liegen in aller Regel unter den Angaben die für in der Frühträchtigkeit geschlachtete Empfängertiere gemacht werden. Die Embryoüberlebensraten von 32,2% in der Kontrollgruppe und 26,4% in der Versuchsgruppe liegen in dem Bereich der von SCHLIEPER (1983) mit 28-35% angegebenen Überlebensraten nach Transfer von Zwei- bis Achtzellstadien.

Die erzielten Wurfgrößen mit durchschnittlich 6,3 bzw. 5,7 Ferkel pro Sau sind den Ergebnissen von ZIMMERMANN (1984) vergleichbar, der bei einer allerdings geringen Trächtigkeitsrate (50%) eine durchschnittliche Wurfgröße von 7,0 bei Verwendung von Jungsaugen als Empfängertiere erreichte. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist aber zu beachten, daß es sich bei den Empfängertieren im eigenen Versuch um präpuberale Tiere handelte, so daß ein negativer Einfluß des juvenilen Zustands der Tiere auf die Wurfgröße nicht ganz auszuschließen ist.

7. Mögliche Schlußfolgerungen für die Tierzucht

Die Auswirkungen der Gentechnologie auf die Tierzucht und die Tierproduktion, sind wohl noch nicht voll abzusehen. Sicher ist jedoch in nicht allzuferner Zukunft mit entscheidenden Fortschritten auf diesem Gebiet zu rechnen. Dies zeigen die Erfolge von HAMMER et al. (1985) und BREM et al. (1985) bei den Versuchen zur Erzeugung transgener Nutztiere.

Die Tierproduktion wird vor allem durch in Bakterienkulturen hergestellte Impfstoffe, verbesserte Antibiotica und Hormone von der Gentechnologie profitieren. Es wird auch die Möglichkeit diskutiert, gentechnisch veränderte Pansenmikroorganismen die Effektivität der Wiederkäuerfütterung zu steigern bzw. die Tiere auch an extreme Futterrationen anpassen zu können, SMITH und HESPEL (1983).

In der Tierzucht reichen die Einsatzmöglichkeiten von der Erbfehleranalyse, GRAF und BREM (1985), eine Technik die in der Humanmedizin immer häufiger Anwendung findet, über die Bestimmung und Lokalisation von Gensequenzen bis hin zur Erzeugung transgener Tiere. Auf diesem Gebiet sind zwei sehr verschiedene Ansatzpunkte zu unterscheiden.

Zum einen wäre an die gezielte Übertragung einzelner, tierzüchterisch interessanter Gene zu denken. Der Vorteil liegt darin, daß hier keine unbekannten oder gar unerwünschte Gene mit in das Genom eingebracht werden, GRAF und BREM (1985). Gentransfer könnte auch zur Reaktivierung von Genen aussterbender Nutztierassen eingesetzt werden, BREM und GRAF (1983). Wenn es gelingt, Gene dieser Rassen zu isolieren und zu konservieren, könnten diese später durch Geninjektion in noch bestehende Rassen eingebracht und dadurch reaktiviert werden.

Auf der anderen Seite steht das sogenannte 'gene farming' ein Begriff der von PALMITER et al. (1982) eingeführt wurde. Darunter versteht man die genetische Veränderung landwirtschaftlicher Nutztiere zur Erzeugung von biologischen Substanzen, etwa von Hormonen oder Proteinen für die pharmazeutische Industrie bzw. die biologische Forschung.

Bislang stehen jedoch kaum Gene zur Verfügung, die sinnvoll eingesetzt werden können. Zudem werden die meisten tierzüchterisch interessanten phänotypischen Merkmale von mehreren Genen gesteuert, sind also polygener Natur. Von den meisten dieser Merkmale sind aber weder die Gene noch der Mechanismus des Zusammenwirkens der Gene bekannt. Aus diesem Grund ist verständlicherweise vorerst nur an den Transfer von Einzelgenen zu denken.

Weiterhin ist das Genom landwirtschaftlicher Nutztiere im Verhältnis zur Maus und zum Menschen noch relativ wenig untersucht. So gibt es nach STRANZINGER et al. (1984) beim Schwein erst 5 und beim Rind lediglich 4 chromosomale Zuweisungen, im Gegensatz zum Menschen mit bereits 296 chromosomalen Zuweisungen.

Ein zusätzliches Problem, das den Einsatz dieser Technik in der Tierzucht erschweren könnte, ist die bisher noch ungeklärte Frage der Fruchtbarkeit transgener Tiere. Obwohl es transgene Mäuse gibt, die sich völlig normal fortpflanzen, ist zu bedenken, daß Tiere mit Chromosomenanomalien häufig unfruchtbar sind.

Abschließend läßt sich sagen, daß die Möglichkeiten der Genommanipulation sicher in Zukunft außerordentlich interessante Perspektiven in der Tierzucht eröffnen können. Um jedoch als Standardmethode in Zuchtprogrammen eingesetzt werden zu können, muß noch viel an Grundlagenforschung betrieben werden. Dabei ist vor allem an die Aufklärung von DNS-Sequenzen, die Erstellung von Chromosomenkarten, die Aufklärung von Erbgängen, und auch an die Überprüfung der Überlebensrate der Embryonen nach der Mikroinjektion zu denken.

8. Zusammenfassung

Von August 1984 bis Januar 1985 wurden Untersuchungen zur Gewinnung, Kultivierung, Vorkerndarstellung und zum Transfer von Schweinezygoten am Lehr- und Versuchsgut der Universität München durchgeführt.

Für die Versuche wurden 75 präpuberale Jungsauen als Spendertiere und 36 präpuberale Jungsauen als Empfängertiere vorbereitet. Die Auslösung der Superovulation bei den Spendern erfolgte mit PMSG, eine hCG-Gabe 72 Stunden nach PMSG diente der Ovulationsauslösung und -synchronisation.

Von 88% der Spendertiere konnten in Durchschnitt 35,8 (SD 25,9) Embryonen gewonnen werden. Es zeigte sich eine lineare Abhängigkeit des Superovulationserfolges von der PMSG-Dosis. Die Ausspülrate betrug 90,1%. Der Entwicklungsstand der Embryonen war von der Zeit zwischen hCG-Injektion und Embryogewinnung abhängig. Bis zur 62. Stunde wurden 85,1% Einzellstadien gewonnen. Zwischen der 62. und 64. Stunde sank dieser Anteil auf 76,3% ab. Der Gesamtanteil an unbefruchteten Eizellen betrug 21,5%.

Bei der Kultivierung von Ein-, Zwei- und Vierzellern in zwei verschiedenen Kulturmedien wurden nur geringe Weiterentwicklungsraten erzielt.

Durch Zentrifugation bei 15 000 g konnten Vorkerne bei Zygoten und Kerne bei Zweizellern sichtbar gemacht werden. Die Zentrifugation für 3 Minuten war der 2-minütigen Zentrifugationsdauer signifikant überlegen. Die Darstellungsrate betrug 76% bei 3 Minuten und 34% bei 2 Minuten. Bei den Zweizellern wurde eine Darstellungsrate von 80% erreicht.

Es wurden jeweils 9 Transfers zentrifugierter und nicht zentrifugierter Zygoten in den Eileiter durchgeführt. Sie ergaben gleiche Trächtigkeitsraten und nur geringfügig unterschiedliche Embryoüberlebensraten. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug 6,3 Ferkel in der Versuchsgruppe und 5,7 Ferkel in der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Zentrifugation eine relativ einfache und doch wirkungsvolle Methode zur Vorkern- und Kerndarstellung ist. Es konnte keine Beeinträchtigung der Überlebensfähigkeit der zentrifugierten Zygoten festgestellt werden.

8. Summary

Vizualisation of pronuclei in swine zygotes

From August 1984 to January 1985 investigations concerning recovery, in vitro cultivation, visualization of pronuclei and transfer of porcine zygotes were carried out at the Lehr- und Versuchsgut of the University of Munich.

75 prepuberal gilts of the German Landrace Breed were stimulated as donors and 36 prepuberal gilts were synchronized to serve as recipients. PMSG was used for hormonal stimulation, followed by an injection of hCG 72 hours later to synchronize ovulation.

88% of the prepared donors showed a good response to superovulation and an average of 35,8 (SD 25,5) embryos could be recovered from these animals. Ovarian response to hormonal stimulation was linear depending on dose of PMSG injected and a recovery rate of 90,1% was achieved. Stage of development of the embryos was depending on time between hCG injection and recovery. Up to an interval of 62 hours 85,1% of recovered embryos were flushed out as 1-cell embryos. If recovery was done 62 to 64 hours after administration of hCG the percentage of 1-cell embryos recovered diminished to 76,3%. 21,5% of all eggs recovered were not fertilized.

Only a moderate development during in vitro cultivation in two different media could be achieved with embryos recovered about 60 to 64 hours after injection of hCG.

In swine pronuclei and nuclei are normally invisible. In order to visualize pronuclei, zygotes were centrifuged with 15 000 g. Results were significantly better if centrifugation was done for 3 minutes compared with a centrifugation of only 2 minutes. The part of zygotes with pronuclei visible was 76% after a 3 minutes centrifugation compared to 34% after 2 minutes. In 80% of the 2-cell embryos nuclei were visible after centrifugation for 3 minutes.

Nine transfers were done with centrifuged and with untreated zygotes respectively. No differences of pregnancy rate were found. The average litter size of recipients was 6,3 (centrifuged) and 5,7 (control) and embryonic survival rate was similar in both groups.

Results indicate that centrifugation of porcine embryos is an effective method to make pronuclei and nuclei visible. No remarkable alteration of the embryos or a reduction of survival rate is caused by centrifugation.

9. Literaturverzeichnis

ADAMS, C.E. (1982)

Factors Affecting the Success of Egg Transfer

In 'Mammalian Egg Transfer' C.E. Adams (ed), CRC Press Inc.

Chapter 10, 175-183

ALANKO, M. (1965)

The Site of Recovery and Cleavage Rate of Pig Ova from the Tuba
Uterina

Nord. Vet.-Med., 17, 323-327

ALLEN, W.R. (1984)

Aspects of Early Embryonic Development in Farm Animals

10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial

Insemination, Illinois, June 10.-14. 1984, XIII-1 - XIII-9

ALTENHOF, R.L., TANKSLEY, T.D., Jr., KNABE, D.A., HARMS, P.G.,

BOWEN, M.J. und KRAEMER, D.C. (1982)

Investigations of Nonsurgical Embryo Collection in Swine

Theriogenology 17, 1, 75

ANDERSEN, D.H. (1928)

Comparative Anatomy of tubo-uterine Junction. Histology and

Physiology in the Sow

Am. J. Anat. 42, 255-305

BAKER, L.N., ULBERG, L.C., GRUMMER, R.H. und CASIDA, L.E. (1954)

Inhibition of Heat by Progesterone and its Effect on Subsequent

Fertility in Gilts

J. Anim. Sci. 13, 648-657

BAKER, R.D. (1979)

Embryo Recovery from Prepuberal Gilts

Theriogenology 11, 1, 91 (Abstract)

BAKER, R.D. und COGGINS, E.G. (1968)

Control of Ovulation Rate and Fertilization in Prepuberal Gilts
J. Anim. Sci. 27, 1607-1610

BAKER, R.D. und DOWNEY, B.R. (1975)

Induction of Estrus, Ovulation and Fertility in Prepuberal Gilts
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 15, 2, 375-382

BAKER, R.D., DZIUK, P.J. und NORTON, H.W. (1967)

Polar Body and Pronucleus Formation in the Pig Egg
J. Exp. Zool. 164, 491-498

BAKER, R.D., SHAW, G.A. und DOWNEY, B.R. (1974)

Effect of PMSG + HCG or GnRH on Ovulation in Gilts
J. Anim. Sci. 39, 197 (Abstract)

BASKEEV, E.D., ELZE, K. GIL'MAN, S.D., HEIDLER, W., HÜHN, E.U.,
HÜHN, R., KLINSKI, J.D., KÖNIG, I., MAJERCIK, P., NOWAK, P.,
ROMMEL, P., SCHLEGEL, W., SZILVASSY, B. und WIERZCHOS, E. (1982)
Biotechnische Fortpflanzungssteuerung bei weiblichen Schweinen
In 'Fortpflanzung bei Schweinen', I. König (Ed.) VEB Deutscher Land-
wirtschaftsverlag, Berlin, 201-211

BAZER, F.W., GLAWSON, A.J., ROBISON, O.W. und ULBERG L.C. (1969)

Uterine Capacity in Gilts
J. Reprod. Fert. 18, 121-124

BERGFELD, J., RAASCH, M.-L., ROHLING, H. und SKOERIES, H.-J. (1979)
Erste Untersuchungen zur Ovulationssynchronisation bei Jung- und Alt-
sauen durch Behandlung mit PMSG und Kombinationen von HCG und Gn-RH
Vet. "Berlin-Chemie" unter Produktionsbedingungen
Mh. Vet.- Med. 34, 615-617

BERGFELD, J., SCHNURRBUSCH, U., BRÜSSOW, K.-P. und KALTOFEN, U.
(1981)

Zur Ovardiagnostik in der Schweineproduktion
Mh. Vet.- Med. 36, 807-811

BETTERIDGE, K.J. (1981)

An historical look at embryo transfer

J. Reprod. Fert. 62 1-13

BLICHFELD, T. und ALMLID, T. (1982)

The Relationship between Ovulation Rate and Embryonic Survival in
Gilts

Theriogenology 18, 5, 615-620

BOSTEDT, H. (1980)

Zur Therapie und Prophylaxe von Fortpflanzungsstörungen beim weib-
lichen Schwein

Collegium Veterinarium 1980, 84-88

BRAUNE, S. und SCHLEGEL, W. (1975)

Untersuchungen über Möglichkeiten einer Pubertätsvorverlagerung mit
Hilfe der Brunst- bzw. Ovulationssynchronisation

Mh. Vet.- Med. 30, 19, 727-730

BREM, G. und GRAF, F. (1983)

Potentielle Anwendung der Gentechnik für die Anlage von Genreserven

Seminar für Haustiergenetik, Wien 24/25 März 1983

BREM, G., GRAF, F., BRENIG, B., KRUFF, B., SPRINGMANN, K., MEYER, J.,
HONDELE, J., WINNACKER, E.-L., und KRÄUSSLICH, H. (1985)

Versuche zur Erstellung transgener Tiere

Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. und
der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft, Bonn, 19. und 20. Sept.

1985, II-27

BRINSTER, R.L. (1965a)

Studies on the Development of Mouse Embryos in Vitro

II. The Effect of Energy Source

J. Exp. Zool. 158, 59-68

BRINSTER, R.L. (1965b)

Studies on the Development of Mouse Embryos in Vitro

III. The Effect of Fixed-Nitrogen Source

J. Exp. Zool. 158, 69-78

BRINSTER, R.L. (1965c)

Studies on the Development of Mouse Embryos in Vitro

IV. Interaction of Energy Sources

J. Reprod. Fert. 10, 227-240

BRINSTER, R.L., CHEN, H.Y., TRUMBAUER, M., SENEAR, A.W., WARREN, R.,
und PALMITER, R.D. (1981)

Somatic expression of Herpes Thymidine Kinase in mice following in-
jection of fusion genes into eggs

Cell 27, 223-231

BRÜSSOW, K.-P. (1985)

Über die Verteilung der Eizellen im Eileiter von Jungsauen nach
Ovulationssynchronisation

Mh. Vet.- Med. 40, 264-268

CHANG, M.C. (1949)

Effects of Heterologous Sera on Fertilized Rabbit Ova

J. Gen. Physiol. 32, 291-300

CHENG, S.P., SCHILLING, E., ELSAESSER, F. und SMIDT, D. (1982)

Einfluß von Superovulation und hohen Plasma-Progesteronwerten bei
Jungsauen auf die Embryonalentwicklung in der Präimplantationsphase
Zuchthyg. 17, 71-77

CHRISTENSON, R.K. und TEAGUE, H.S. (1975)

Synchronization of Ovulation and Artificial Insemination of Sows
after Lactation

J. Anim. Sci. 41, 2, 560-563

CHUNG, C.S., ETHEERTON, T.D. und WIGGINS, J.P. (1985)

Stimulation of Swine Growth by Porcine Growth Hormone

J. Anim. Sci. 60, 118-130

CURNOCK, R.M., DAY, B.N. und DZIUK, P.J. (1976)

Embryo Transfer in Pigs: A Method for Introducing Genetic Material
into Primary Specific-Pathogen-Free Herds

Am. J. Vet. Res. 37, 97-98

DAVIS, D.L. und DAY, B.N. (1978)

Cleavage and Blastocyst Formation by Pig Eggs in Vitro

J. Anim. Sci. 46, 4 1043-1053

DAVIS, D.L. und JAMES, J.E. (1984)

Embryo Transfer in Swine

Modern Veterinary Practice 65, 191-195

DAVIS, D.L., KNIGHT, J.W., KILLIAN, D.B. und DAY, B.N. (1979)

Control of Estrus in Gilts with a Progestogen

J. Anim. Sci. 49, 1506-1509

DAY, B.N. (1979)

Embryo Transfer in Swine

Theriogenology 11, 1, 27-31

DAY, B.N. (1980)

Procedures and Results Obtainable in Pigs

In 'Current Therapy in Theriogenology' Section III: Embryo Transfer

D.A. Morrow (ed), 95-100

DIEHL, J.R. und DAY, B.N. (1973)

Effect of Prostaglandin F 2 alpha on Luteal Function in Swine

J. Anim. Sci. 37, 307-308

DOOLITTLE, W.F. (1978)

Genes in Pieces: Were They Ever Together?

Nature 272, 581-582

DZIUK, P. (1960)

Frequency of Spontaneous Fragmentation of Ova In Unbred Gilts

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 91-92

DZIUK, P.J. (1969)

Egg Transfer in Cattle, Sheep and Pigs

In 'The Mammalian Oviduct' E.S.E. Hafez and R.J. Blandau (eds)

The University of Chicago Press, 407-417

DZIUK, P.J. und BAKER, R.D. (1962)

Induction and Control of Ovulation in Swine

J. Anim. Sci. 21, 697-699

DZIUK, P.J. und POLGE, C. (1965)

Fertility in Gilts following Induced Ovulation

The Veterinary Record 77, 9, 236-239

DZIUK, P.J., POLGE, C. und ROWSON, L.E. (1964)

Intra-Uterine Migration and Mixing of Embryos in Swine Following Egg Transfer

J. Anim. Sci. 23, 37-42

ELLENDORFF, F. und SMIDT, D. (1984)

Endokrinologie des Sexualzyklus der Sau

Tierärztl. Umschau 39, 429-432

FIRST, N.L., STRATMAN, F.W., RIGOR, E.M. und CASSIDA, L.E. (1963)

Factors Affecting Ovulation and Follicular Cyst Formation in Sows and Gilts Fed 6-Methyl-17-Acetoxyprogesterone

J. Anim. Sci. 22, 66-71

GERRITS, R.J., FAHNING, M.L., MEADE, R.J. und GRAHAM, E.F. (1962)

Effect of Synchronization of Estrus on Fertility in Gilts

J. Anim. Sci. 21, 1022 (Abstract)

GILBERT, W. (1979)

Introns and Exons: Playgrounds of Evolution

In ' Eucariotic Gene Regulation ' R. Axel, T. Maniatis und C.F. Fox (eds) Academic Press

GORDON, J.W. und RUDDLE, F.H. (1981)

Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei

Science 214, 1244-1246

GRAF, F. und BREM, G. (1985)

Zur Anwendung der Gentechnik in der Tierzucht

Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. und
der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft, Bonn, 19. und 20. Sept.
1985, II-28

GUTHRIE, H.D. (1977)

Induction of Ovulation and Fertility in Prepuberal Gilts

J. Anim. Sci. 45, 6, 1360-1367

GUTHRIE, H.D. und POLGE, C. (1976a)

Luteal function and oestrus in gilts treated with a synthetic analogue
of prostaglandin F-2 alpha (ICI 79,939) at various times during the
oestrous cycle

J. Reprod. Fert. 48, 423-425

GUTHRIE, H.D. und POLGE, C. (1976b)

Control of oestrus and fertility in gilts with accessory corpora lutea
by prostaglandin analogues, ICI 79,939 and ICI 80,996

J. Reprod. Fert. 48, 427-430

GUTHRIE, H.D. und POLGE, C. (1978)

Treatment of pregnant gilts with a prostaglandin analogue, clo-
prostenol, to control oestrous and fertility

J. Reprod. Fert. 52, 271-273

GUTHRIE, H.D., HENRICKS, D.M. und HANDLIN, D.L. (1974)

Plasma Hormone Levels and Fertility in Pigs Induced to Superovulate
with PMSG

J. Reprod. Fert. 41, 361-370

HAMMER, R.E., PURSEL, V.G., REXROAD, C.E. Jr., WALL, R.J., BOLT, D.J.,
EBERT, K.M., PALMITER, R.D. und BRINSTER, R.L. (1985)

Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection
Nature 315, 680-683

HANCOCK, J.L. (1958)

The Examination of Pig Ova

The Veterinary Record, 70, 50, 1200-1201

HANCOCK, J.L. (1961)

Fertilization in the Pig

J. Reprod. Fert. 2, 307-331

HANCOCK, J.L. und HOVELL, G.J.R. (1962)

Egg Transfer in the Sow

J. Reprod. Fert. 4, 195-201

HARMS, E. und SMIDT, D. (1970)

Untersuchungen zur in-vitro-Befruchtung folliculärer und tubaler Eizellen vom Schwein

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 83, 14, 269-275

HEAPE, W. (1891)

Preliminary Note on the Transplantation and Growth of Mammalian Ova within a Uterine Foster-Mother

Proc. of the Royal Soc. London 48, 457-458

HERRMANN, H.H. (1979)

Kultivierung, Transfer und Befruchtung von Schweineeizellen

Diss. agr. Göttingen

HERRMANN, H.H. und HOLTZ, W. (1981)

Culture of Pig Embryos Collected in Situ or after Slaughter

Animal Reproduction Science 4, 143-147

HERRMANN, H.H., SCHÄFER, B. und HOLTZ, W. (1981)

Collection of Two-Cell Pig Embryos and their Culture in Media Containing Different Protein Components

Animal Reproduction Science 4, 137-142

HOLTZ, W., KAUFMANN, F. von, HERRMANN, H.H., PICH, S. und POLANCO, A. (1977)

Die Steuerung von Brunst und Ovulationszeitpunkt bei Jungsaue
Zuchthyg. 12, 91-92

HOLTZ, W., POLANCO, A., KAUFMANN, F. von, HERRMANN, H.H.,
SEIDENKRANZ, H.G. und SMIDT, D. (1978)

Die Auslösung von Brunst und Ovulation durch Gonadotropin-Behandlung
bei präpuberalen Jungsauen

Zbl. Vet. Med. A. 25, 247-252

HÜHN, U. und SCHLEGEL, W. (1977)

Zum Stand der Ovulationssynchronisation und terminorientierten
Besamung bei Jung- und Altsauen

Mh. Vet.- Med. 32, 8, 306-309

HUNTER, R.H.F. (1964)

Superovulation and Fertility in the Pig

Anim. Prod. 6, 189-194

HUNTER, R.H.F. (1966)

The Effect of Superovulation on Fertilisation and Embryonic Survival
in the Pig

Anim. Prod. 8, 457-465

HUNTER, R.H.F. (1967a)

Porcine Ovulation after Injection of Human Chorionic Gonadotrophin
The Veterinary Record 81, 21-23

HUNTER, R.H.F. (1967b)

Effect of Aging Eggs on Embryonic Survival in Pigs

J. Anim. Sci. 26, 945 (Abstract)

HUNTER, R.H.F. (1972)

Fertilization in the Pig: Sequence of Nuclear and Cytoplasmic Events

J. Reprod. Fert. 29, 395-406

HUNTER, R.H.F. (1973)

Polyspermic Fertilization in Pigs after Tubal Deposition of Excessive
Numbers of Spermatozoa

J. Exp. Zool. 183, 57-64

HUNTER, R.H.F. (1974)

Chronological and Cytological Details of Fertilization and Early Embryonic Development in the Domestic Pig, *Sus scrofa*

Anat. Rec. 178, 169-186

HUNTER, R.H.F., POLGE, C. und ROWSON, L.E.A. (1967)

The Recovery, Transfer and Survival of Blastocysts in Pigs

J. Reprod. Fert. 14, 501-502

HURTGEN, J.P. und LEMAN, A.D. (1979)

Use of PMSG in the Prevention of Seasonal Post-Weaning Anestrus in Sows

Theriogenology 12, 4, 207-214

ILLMENSEE, K. und HOPPE, P.C. (1981)

Nuclear Transplantation in *Mus musculus*: Developmental Potential of Nuclei from Preimplantation Embryos

Cell 23, 9-18

JAMES, J.E. und REESER, P.D. (1979)

Embryo Recovery in Swine

Theriogenology 11, 1, 47-50

JAMES, J.E., JAMES, D.M., MARTIN, P.A., REED, D.E. und DAVIS, D.L. (1983)

Embryo transfer for conserving valuable genetic material from swine herds with pseudorabies

JAVMA 183, 5, 525-528

JAMES, J.E., REESER, P.D., DAVIS, D.L., STRAITON, E.C., TALBOT, A.C. und POLGE, C. (1980)

Culture and Long-Distance Shipment of Swine Embryos

Theriogenology 14, 6, 463-469

KARG, H. (1985)

Neue Dimensionen der Endokrinologie und ihre Bedeutung für die Tierproduktion

Der praktische Tierarzt 66, 103-113

KAUFMANN, F. von und HOLTZ, W. (1982)

Induction of ovulation in gonadotropin treated gilts with synthetic gonadotropin releasing hormone
Theriogenology 17, 2, 141-157

KING, G.J. (1969)

Deformities in piglets following administration of methallibure during specific stages of gestation
J. Reprod. Fert. 20, 551-553

KRAELING, R.R. und RAMPACEK, G.B. (1977)

Synchronization of Estrus and Ovulation in Gilts with Estradiol and Prostaglandin F 2 alpha
Theriogenology 8, 2-3, 103-110

KRAELING, R.R., DZIUK, P.J., PURSEL, V.G., RAMPACEK, G.B. und WEBEL, S.K. (1981)

Synchronisation of Estrus in Swine with Allyl Trenbolone (RU-2267)
J. Anim. Sci. 52, 831-835

KRÄUSSLICH, H. (1985)

Neue Techniken in der Tierzucht
Vortrag bei der Mitgliederversammlung der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tierzüchter, Berlin, 25. Januar 1985

KRUFF, B. (1982)

Erfahrungen mit dem Embryotransfer beim Schwein
Der Tierzüchter 34, 292-297

KRUFF, B., LAMPETER, W.W. und KRÄUSSLICH, H. (1983)

Untersuchungen zum Superovulationserfolg und zur Kultur von Embryonen im Rahmen des Embryotransfers beim Schwein
Zuchthyg. 18, 1-6

KRUFF, B., TENHUMBERG, H., DISTL, O. und LAMPETER, W.W. (1981)

Superovulation und Embryogewinnungsraten bei der präpuberalen Jungsau
Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft, Gießen, 24. und 25. 9. 1981

KVASNICKII, A.V. (1951)

Interbreed ova transplantation

Animal Breeding Abstracts 19, 224 (Abstract)

LINDLOFF, G., HOLTZ, W., ELSAESSER, F., KREIKENBAUM, K. und SMIDT, D.
(1976)

The Effect of Prostaglandin F 2 alpha on Corpus Luteum Function in
the Göttingen Miniature Pig

Biology of Reproduction 15, 303-310

LINDNER, G.M. und WRIGHT, R.W., Jr. (1978)

Morphological and Quantitative Aspects of the Development of
Swine Embryos in vitro

J. Anim. Sci. 46, 3, 711-718

LOHSE, J.K., ROBL, J.M., und FIRST, N.L. (1985)

Progress Towards Transgenic Cattle

Theriogenology 23, 1, 205 (Abstract)

LOVELL-BADGE, R.H. (1985)

Transgenic animals: New advances in the field

Nature 315, 628-629

MAJERCIAK, P., SMIDT, D., SCHAHIDI, R. und HARMS, E. (1969)

Untersuchungen zur Eigewinnung von infantilen weiblichen Schweinen
I. Mitteilung

Zeitschr. für Tierzüchtung u. Züchtungsbiologie 86, 89-100

MAJERCIAK, P., SMIDT, D., SCHAHIDI, R. und HARMS, E. (1970)

Untersuchungen zur Eigewinnung von infantilen weiblichen Schweinen
II. Mitteilung

Zeitschrift f. Tierzüchtung u. Züchtungsbiologie 86, 216-231

MARKERT, C.L. (1984)

Genetic Manipulation of Mammalian Embryos: Current Techniques and their
Potential Usefulness in Livestock Improvement

10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial In-
semination, Jllinois, June 10.-14. 1984, II-13 - II-19

MARTIN, P.A. (1983)

Commercial Embryo Transfer in Swine: Who is Interested in it and why
Theriogenology 19, 1, 43-48

MAYER, P. und SCHÜTZE, E. (1977)

A New Progestin (Sa 45.249) for Cycle Control in Pigs
Communication I: Hormonal Activities and Dosage
Theriogenology 8, 6, 357-366

MC GRATH, J. und SOLTER, D. (1984)

Completion of Mouse Embryogenesis Requires Both the Maternal and
Paternal Genomes
Cell 37, 173-183

MEINECKE, B., MEINECKE-TILLMANN, S. und BLANCO, C. (1983)

Die Befruchtungs- und embryonale Entwicklungskapazität extrakorporal
gereifter Oozyten des Schweines
Zuchthyg. 18, 145-156

MENINO, A.R., Jr. und WRIGHT, R.W., Jr. (1982)

Development of One-Cell Porcine Embryos in two Culture Systems
J. Anim. Sci. 54, 3, 583-588

MEREDITH, S., YANKOWSKY, A., Ball, G.D., HARRIS, H. und DAY, B.N.
(1979)

A Laparoscopic Technique for Embryo Transfer in Swine
J. Anim. Sci. 49, Supplement 1, 117 (Abstract)

MEYER, J.-N. und SMIDT, D. (1973a)

Untersuchungen zur in vitro-Befruchtung tubaler Schweineeizellen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86, 6, 104-106

MEYER, J.-N. und SMIDT, D. (1973b)

Untersuchungen zur in vitro-Befruchtung tubaler Schweineeizellen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86, 7, 121-125

MINHAS, B.S., CAPEHART, J.S., BOWEN, M.J., WOMACK, J.E., MC CRADY, J.D., HARMS, P.G., WAGNER, T.E. und KRAEMER, D.C. (1984)
Visualization of Pronuclei in Living Bovine Zygotes
Biology of Reproduction 30, 687-691

NANCARROW, C.D., MURRAY, J.D., BOLAND, M.P., HAZELTON, I.G. und SUTTON, R. (1984)
Towards Gene Transfer into Ruminant Embryos : Effect of Centrifugation
Theriogenology 21, 1, 248 (Abstract)

NELLOR, J.E., AHRENHOLD, J.E., FIRST, N.L., und HOEFER, J.A. (1961)
Estrus, Ovulation and Fertility in Gilts subsequent to the Oral Administration of 6-methyl-17 acetoxypregesterone
J. Anim. Sci. 20, 22-30

NIEMANN, H. und ELSAESSER, F. (1984)
Uptake and Effects of Ovarian Steroids in the Early Pig Embryo: In Vitro and In Vivo Studies
Theriogenology 21,1, 84-102

NIEMANN, H., ILLERA, M.J. und DZiUK, P.J. (1983a)
Developmental Capacity, Size and Number of Nuclei in Pig Embryos Cultured in Vitro
Animal Reproduction Science 5, 311-321

NIEMANN, H., SCHILLING, E. und ELSAESSER, F. (1983b)
Einfluß erhöhter Plasma-Progesteronwerte auf Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung bei Rind und Schwein
Verhandlungsbericht: VIII. Veterinär-Humanmedizinische Tagung, Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung
München 17.-19. Februar 1983, 174-176

NORBERG, H.S. (1973)
Ultrastructure of Pig Tubal Ova
The Unfertilized and Pronuclear Stage
Z. Zellforsch. 141, 103-122

OSTERMANN, L. und SMIDT, D. (1973)

Untersuchungen über Ablauf und Beeinflußbarkeit der sexuellen Entwicklung bei weiblichen Schweinen

III. Versuche zur Ovulationsinduktion und Eigewinnung bei weiblichen Schweinen der Deutschen Landrasse im Alter von 15 Wochen

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 80, 254-257

OXENREIDER, S.L. und DAY, B.N. (1965)

Transport and Cleavage of Ova in Swine

J. Anim. Sci. 24, 413-417

PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L., HAMMER, R.E., TRUMBAUER, M.E.

ROSENFELD, M.G., BIRNBERG, N.C. und EVANS, R.M. (1982)

Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes

Nature 300, 611-615

PEEL, C.J., BAUMAN, D.E., GOREWIT, R.C. und SNIFFIN, C.J. (1981)

Effect of exogenous growth hormone on lactational performance in high yielding dairy cows.

J. Nutr. 111, 1662-1671

PERRY, J.S. und ROWLANDS, I.W. (1962)

Early Pregnancy in the Pig

J. Reprod. Fert. 4, 175-188

POLANCO, A., HERRMANN, H.H., KAUFMANN, F. von, KALM, E., SMIDT, D. und HOLTZ, W. (1978)

Die Bestimmung des Ovulationszeitpunktes bei mit Gonadotropinen vorbehandelten präpuberalen Jungsauen

Zbl. Vet. Med. A. 25, 608-616

POLGE, C. (1965)

Effective Synchronisation of Oestrus in Pigs after Treatment with ICI Compound 33828

The Veterinary Record 77, 9, 232-236

POLGE, C. (1966)

Egg transplantation in the pig

World Rev. of Anim. Prod. 2, 79-84

POLGE, C. (1977)

Short-Term Maintenance and Culture of Embryos

In 'Embryo Transfer in Farm Animals', K.J. Betteridge (ed.)

Monograph No.16, Agriculture Canada, 40-46

POLGE, C. (1982)

Embryo Transfer in Pigs

Congres international transfert d' embryons chez les mammiferes

Annecy, 20.- 22. September 1982 (Abstract)

POLGE, C. und DAY, B.N. (1968)

Pregnancy Following Non-surgical Egg Transfer in Pigs

The Veterinary Record 82, 712 (Abstract)

POLGE, C. und DZIUK, P. (1965)

Recovery of Immature Eggs Penetrated by Spermatozoa Following Induced
Ovulation in the Pig

J. Reprod. Fert. 9, 357-358

POLGE, C. und DZIUK, P.J. (1970)

Time of Cessation of Intrauterine Migration of Pig Embryos

J. Anim. Sci. 31, 565-566

POPE, C.E. und DAY, B.N. (1970)

Cleavage and Survival of Swine Ova Cultured in Vitro

J. Anim. Sci. 31, 1035 (Abstract)

POPE, C.E. und DAY, B.N. (1977)

Transfer of Preimplantation Pig Embryos Following in Vitro Culture
for 24 or 48 Hours

J. Anim. Sci. 44, 6, 1036-1040

POPE, C.E., CHRISTENSON, R.K., ZIMMERMAN-POPE, V.A. und
DAY, B.N. (1972)

Effect of Number of Embryos on Embryonic Survival in Recipient Gilts
J. Anim. Sci. 35, 4, 805-808

POPE, W.F. und FIRST, N.L. (1985)

Factors Affecting the Survival of Pig Embryos
Theriogenology 23, 1, 91-105

POPE, W.F., MAURER, R.R. und STORMSHAK, F. (1982)

Survival of Porcine Embryos after Asynchronous Transfer
Proc. of the Soc. f. Experimental Biology and Medicine 171, 179-183

RAASCH, M.-L., BERGFELD, J., HEIDLER, W. und MAXIMOWITZ, E. (1984)

Vergleichende Untersuchungen zur Ovulationssynchronisation bei
Altsauen mit PMSG und HCG bzw. einer Gn-RH/HCG-Kombination
unter verschiedenen Produktionsbedingungen
Arch. Tierzucht, Berlin 27, 3, 257-261

REUTHER, E., FRITZSCH, M., BERGFELD, J. und SIELAND, W. (1975)

Untersuchungen zur biotechnischen Ovulationssynchronisation und
terminorientierten Besamung von Altsauen mit PMS (Prolosan-Serum
"Dessau") und HCG (Gonabion Dresden)
Mh. Vet.- Med. 30, 6, 211-216

ROBL, J.M. und DAVIS, D.L. (1981)

Effects of Serum on Swine Morulae and Blastocysts in Vitro
J. Anim. Sci. 52, 6, 1450-1456

ROTTMAN, O.J., STRATOWA, CH., HORNSTEIN, M., und HOFSCHEIDER, P.H.
(1984)

Gentransfer in Blastozysten mittels Liposomen: Erste Ergebnisse
35. Jahrestagung der EVT, 6.-9. August 1984, Den Haag, G2.5 (Abstract)

RÜSSE, I. (1978)

Struktureigentümlichkeiten der Eizelle vom Rind, Schaf und Schwein
Verhandlungsbericht: Veterinär-Humanmedizinische Tagung,
Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung
Gießen, 17./18. Februar 1978, 17-18

RUNDELL, J.W. und VINCENT, C.K. (1968)

In Vitro Culture of Swine Ova

J. Anim. Sci. 27, 1196 (Abstract)

RUNDELL, J.W. und VINCENT, C.K. (1969)

Growth of Tubal Swine Ova in Vivo and in Vitro

J. Anim. Sci. 28, 145-146 (Abstract)

RUSCONI, S. und KÖHLER, G. (1985)

Transmission and expression of a specific pair of rearranged
immunoglobulin u and k genes in a transgenic mouse line

Nature 314, 330-334

RUSSEL, W.C., NEWMAN, C. und WILLIAMSON, D.H. (1975)

A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells
infected with mycoplasmas and viruses

Nature 253, 461-462

SCHILLING, E. und CERNE, F. (1973)

Die Reaktionsfähigkeit des Ovars von praepuberalen und geschlechts-
reifen Jungsauen auf ein PMS/HCG-Präparat

Zuchthyg. 8, 49-54

SCHILLING, E. und MINAR, M. (1971)

Die hormonale Stimulation des Schweineovars zur Zeit der Geschlechts-
reife

Zbl. Vet. Med. A, 18, 277-288

SCHILLING, E., CERNE, F. und MINAR, M. (1971)

Induktion und Synchronisation von Brunst und Ovulation bei präpu-
beralen Jungsauen und ihre Fruchtbarkeit nach künstlicher Besamung

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 78, 149-153

SCHLEGEL, W., BIEDERMANN, H., STENZEL, S. und WÄHNER, M. (1978)

Untersuchungen zum Einfluß einer unterschiedlichen Dosierung von HCG
bei der Pubertätsinduktion von Jungsauen auf Follikelreifung und
-bildung, Uterusentwicklung und Ovulationsstatus

Mh. Vet.- Med. 33, 17, 657-660

SCHLEGEL, W. und WÄHNER, M. (1980)

Zur Nutzung des induzierten bzw. 2. Östrus bei pubertätsinduzierten
Jungsauen

Mh. Vet.- Med. 35, 661-665

SCHLIEPER, B. (1983)

Embryotransfer beim Schwein -

Erfolg in Abhängigkeit vom Induktions- und Gewinnungsmodus

Diss. agr. Göttingen

SCHNEIDER, H.J., Jr., KRUG, J.L. und OLDS, D. (1975)

Observations on Recovery and Culture of Sow Ova

J. Anim. Sci. 40, 187

SCHÜTZE, E. und MAYER, P. (1977)

A New Progestin (Sa 45.249) for Cycle Control in Pigs Communication II:
Duration of Treatment and Effectiveness as an Estrous Cycle
Synchronizer

Theriogenology 8, 6, 367-377

SMIDT, D., STEINBACH, J. und SCHEVEN, B. (1965)

Modified Method for the in-Vivo Recovery of Fertilized Ova in Swine

J. Reprod. Fert. 10, 153-156

SMITH, C.J. und HESPEL, R.B. (1983)

Prospects for development and use of recombinant desoxyribonucleic
acid techniques with ruminal bacteria

J. Dairy Sci. 66, 1536-1546

STIDL, G. (1978)

Untersuchungen über Zyklussteuerung, Superovulation, Embryogewinnung,
-kultivierung und -konservierung beim Schwein

Diss. vet. med. München

STOLLA, R. (1976)

Zyklussteuerung beim Schwein unter experimentellen Bedingungen mit
dem Gestagen Sandoz 45.249

Zuchthyg. 11, 86-87

STONE, B.A., WHYTE, P.B.D., POINTON, A.M., QUINN, P. and HEAP, P.A.
(1984a)

Transfer of pig embryos collected from a sow slaughtered at an
abattoir

Australian Veterinary Journal 61, 1, 30-31

STONE, B.A., QUINN, P. und SEAMARK, R.F. (1984b)

Energy and Protein Sources for Development of Pig Embryos Cultured
Beyond Hatching In Vitro

Animal Reproduction Science 7, 405-412

STRANZINGER, G., VOEGELI, P., DOLF, G., und ELMIGER, B. (1984)

Chromosomenkarten als Werkzeug zur Genhandhabung bei landwirtschaft-
lichen Nutztieren

35. Jahrestagung der EVT, 6.-9. August 1984, Den Haag, G2.3 (Abstract)

SURANI, M.A.H. und BARTON, S.C. (1983)

Development of gynogenetic eggs in the mouse: Implications for
parthenogenetic embryos

Science 222, 1034-1036

SZOLLOSI, D. und HUNTER, R.H.F. (1973)

Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig:
Sperm penetration and pronucleus formation

J. Anat. 116, 2, 181-206

VENGE, O. (1952)

A Method for Continuous Chromosome Control of Growing Rabbits

Nature 169, 590-591

VINCENT, C.K., ROBISON, O.W. und ULBERG, L.C. (1964)

A Technique for Reciprocal Embryo Transfer in Swine

J. Anim. Sci. 23, 1084-1088

WAGNER, T.E., HOPPE, P.C., JOLLIICK, J.D., SCHOOL, D.R., HODINKA,
R.L., und GAULT, J.B. (1981)

Microinjection of a rabbit β -globin gene into zygotes and its sub-
sequent expression in adult mice and their offspring

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6376-6380

- WAGNER, T.E., MURRAY, F.A., MINHAS, B. und KRAEMER, D.C. (1984)
The Possibility of Transgenic Livestock
Theriogenology 21, 1, 29-44
- WAITE, A.B. und DAY, B.N. (1967)
Intrauterine Migration Following Unilateral Fertilization in Gilts
J. Anim. Sci. 26, 790-791
- WALL, R.J., PURSEL, V.G. HAMMER, R.E. und BRINSTER, R.L. (1985)
Development of Porcine Ova That Were Centrifuged to Permit
Visualisation of Pronuclei and Nuclei
Biology of Reproduction 32, 645-651
- WEBEL, S.K., PETERS, J.B. und ANDERSON, L.L. (1970a)
Synchronous and Asynchronous Transfer of Embryos in the Pig
J. Anim. Sci. 30, 565-568
- WEBEL, S.K., PETERS, J.B. und ANDERSON, L.L. (1970b)
Control of Estrus and Ovulation in the Pig by ICI 33828 and
Gonadotropins
J. Anim. Sci. 30, 791-794
- WHITTEN, W.K. und BIGGERS, J.D. (1968)
Complete Development In Vitro of the Pre-Implantation Stages of the
Mouse in a Simple Chemically Defined Medium
J. Reprod. Fert. 17, 399-401
- WRATHALL, A.E., DONE, J.T. STUART, P., MITCHELL, D., BETTERIDGE
K.J. und RANDALL, G.C.B. (1970)
Successful Intercontinental Pig Conceptus Transfer
The Veterinary Record 87, 226-228
- WRIGHT, R.W., Jr., (1977)
Successful Culture in Vitro of Swine Embryos to the Blastocyst Stage
J. Anim. Sci. 44, 5, 854-858

ZEROBIN, K., SCHÜTZE, E. und MAYER, P. (1977)

A New Progestin (Sa. 45.249) for Cycle Control in Pigs

Communication III: Confirmation of Effectiveness in Field Trials

Theriogenology 8, 6, 379-388

ZIMMERMANN, W. (1984)

Embryotransfer beim Schwein

UFA-Revue 2/84, 4-8

Lebenslauf

Ich, Friedrich Vogel wurde am 17. April 1958 als dritter Sohn des Landwirtehepaares Friedrich Vogel und Berta Vogel geb. Ruckser in Schrozberg geboren. Die weiteren Daten sind nachstehender chronologischer Zusammenfassung zu entnehmen.

1965-1968 Grundschule Blaufelden

1968-1977 Gymnasium Gerabronn

24. Mai 1977 Reifeprüfung

1977-1978 Grundwehrdienst

1978-1984 Studium der Tiermedizin in München

15. März 1984 I. Staatsexamen Tiermedizin

12. April 1984 Approbation

August 1984 bis Juli 1985 Anstellung am Institut für Tierzucht und Tierhygiene, gleichzeitig mit dem Anfertigen der vorliegenden Arbeit beschäftigt

Seit 1. August 1985 Anstellung als Assistentstierarzt in der Praxis von H. Hermann in 8531 Dachsbach/Aisch

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kräußlich für die Überlassung des interessanten Themas und die jederzeit gewährte Hilfeleistung

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. B. Kruff für die Zusammenarbeit bei der Durchführung des experimentellen Teils und für die wertvollen Ratschläge beim Verfassen der schriftlichen Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich auch den am experimentellen Teil beteiligten Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsguts und des Instituts für Tierhygiene am Oberwiesenfeld und unter diesen besonders Herrn J. Rieger meinen Dank aussprechen.

